

## PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 2000-184894

(43)Date of publication of application : 04.07.2000

(51)Int.Cl.

C12N 15/09

C12Q 1/04

C12Q 1/68

G01N 21/78

G01N 33/58

(21)Application number : 11-292861

(71)Applicant : JAPAN BIOINDUSTRY ASSOCIATION  
AGENCY OF IND SCIENCE & TECHNOL  
KANKYO ENG CO LTD

(22)Date of filing : 14.10.1999

(72)Inventor : KURANE RYUICHIRO  
KANEKAWA TAKAHIRO  
KAMAGATA YOICHI  
KURATA SHINYA  
YAMADA KAZUTAKA  
YOKOMAKU TOYOICHI  
KOYAMA OSAMU  
KOSHO KENTA

(30)Priority

Priority number : 10293794 Priority date : 15.10.1998 Priority country : JP

(54) ONE PAIR OF NUCLEIC ACID PROBES AND MEASUREMENT OF AMOUNT OF SPECIFIC GROUP OR SPECIFIC MICROORGANISM EXISTING IN COMPOSITE MICROORGANISM SYSTEM OR SYMBIOFIC MICROORGANISM SYSTEM WITH THE PROBES

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To obtain a pair of new nucleic acid probes capable of determining the bacterial strains of a composite microorganism system by labeling plural nucleic acids capable of reacting with target base sequences, respectively, with a pair of fluorescent pigment molecules capable of causing a fluorescence resonance energy transfer phenomenon.

SOLUTION: A pair of nucleic acid probes are obtained by labeling two oligonucleotides with a pair of fluorescent pigment molecules capable of causing a fluorescence resonance energy transfer(FRET) phenomenon. The two oligonucleotides can be hybridized with target base sequences, respectively. Therein, when the two nucleic acid probes are hybridized with the target base sequences, respectively, one of a pair of the fluorescent pigment molecules labels one of the mutually faced molecular ends of the two oligonucleotides, and the other labels the chain of the other oligonucleotide, in order that the fluorescent pigment molecules labeling the nucleic acid probes most effectively cause the fluorescence resonance energy transfer(FRET) phenomenon. A pair of the new nucleic acid probes thereby enable to simply and rapidly measure the amounts of specific bacterial stains in the composite microorganism system.

\* NOTICES \*

JPO and INPIT are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

1. This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
2. \*\*\*\* shows the word which can not be translated.
3. In the drawings, any words are not translated.

---

CLAIMS

---

[Claim(s)]

[Claim 1] By a fluorochrome molecule of a couple which can cause a full ORORE sense Resonance energy transfer (Fluorescence Resonance Energy Transfer) (FRET) phenomenon. They are two nucleic acid probes which carried out the sign of the two oligonucleotides which can carry out hybridization to the separate purpose base sequence, So that a fluorochrome molecule by which the sign is carried out to a nucleic acid probe may generate FRET most effectively, when the two nucleic acid probes concerned carry out hybridization to the purpose base sequence, 1) The sign of one side of a fluorochrome molecule of a couple is carried out to one of the end sides which face mutually in two oligonucleotides, A nucleic acid probe of a couple, wherein the sign of one of other fluorochrome molecules is carried out into a chain of one of other oligonucleotides or the sign of each of a fluorochrome molecule of two couples is carried out into each two chains of an oligonucleotide.

[Claim 2] One of the fluorochrome molecules of a couple by which the sign was carried out to a nucleic acid probe of a couple. By the fluorescein (fluorescein) or a full ORESEN isothiocyanate (fluorescein isothiocyanate) (FITC) which is a fluorochrome molecule (donor fluorochrome molecule) which gives energy in FRET. x-rhodamine which is a fluorochrome molecule (acceptor fluorochrome molecule) from which another side receives the energy concerned (x-Rhodamine), A nucleic acid probe of the couple according to claim 1 which is tetramethylrhodamine isothiocyanate (Tetramethylrhodamine isothiocyanate) (TRITC) or CY3 (carbocyanine 3).

[Claim 3] A nucleic acid probe of the couple according to claim 1 which distance between end bases which face mutually uses the number of bases, and is 0, or 1 thru/or 2 when a nucleic acid probe of a couple carries out hybridization to objective-nucleic-acid arrangement.

[Claim 4] A nucleic acid probe of a couple given in any 1 paragraph of Claims 1-3 which are that in which a nucleic acid probe of a couple carries out hybridization to 16SrRNA, 23SrRNA, or gene DNA of those of eukaryote or a procaryote specifically.

[Claim 5] A pair of nucleic acid probe of a description given in any 1 paragraph of Claims 1-4 whose sum total of the number of bases of a nucleic acid probe of a couple is 16 to 50 when a nucleic acid probe of a couple carries out hybridization to a target base sequence.

[Claim 6] A nucleic acid probe of a couple given in any 1 paragraph of Claims 1-5 which a mismatch of a little salt group does not have in target-nucleic-acid arrangement which consists of the following base sequence, either, and carry out hybridization.

1) (5') TCT CAA ACT AGG. ACC GAG TC(3')2(5')ATT. GTG TAC GTT CAG CTT. GC(3')3(5')GAT GCG. CTC CGT CGT CAC CC 4 (3') (5') GGG TGA CGA CGG AGG GCA TC(3') 5 (5') GTC GTC GGC GCC ATT ATG 6(3')5(5') CAT. AAT GGC GCC GAC GAC(3')7(5')TTT GAG TTT CCT TAA CTG CC(3')8(5')GGC AGT TAA GGA AAC TCA AA(3') 9(5')GTA CCG ACA GCA GTC GAG CA(3')10(5')TGC TCG ACT GCT GTC GGT AC(3')11(5')TGC CCG CCA CAC ATG(3')

12(5')TTC CTC CAC TAG GTC GGC GT(3') [Claim 7] A nucleic acid probe given in any 1 paragraph of Claims 1-5 which a mismatch of a little salt group does not have in target base sequences other than the following base sequence, either, and carry out hybridization to them.

1) (5') TCT CAA ACT AGG. ACC GAG TC(3')2(5')ATT. GTG TAC GTT CAG CTT. GC(3')3(5')GAT GCG. CTC CGT CGT CAC CC 4 (3') (5') GGG TGA CGA CGG AGG GCA TC(3') 5 (5') GTC GTC GGC GCC ATT ATG 6(3')5(5') CAT. AAT GGC GCC GAC GAC(3') 7 (5') TTT GAG TTT CCT TAA CTG CC(3') 8 (5') GGC AGT TAA GGA AAC TCA AA (3') 9(5')GTA. CCG ACAGCA GTC GAG CA(3') 10 (5') TGC TCG ACT GCT GTC GGT AC(3') 11(5')TGC CCG CCACAC ATG(3')12(5')TTC. CTC CAC TAG GTC GGC GT(3')

[Claim 8] How to carry out measurement or detection of nucleic acid using a nucleic acid probe of a couple of a description for any 1 paragraph of Claims 1-7.

[Claim 9] How to measure abundance of a particular group or a specific bacillus in a compound microorganism system or a symbiotic-microorganisms system adding a nucleic acid probe of a couple given in any 1 paragraph of Claims 1-7 in a compound microorganism system or a symbiotic-microorganisms system.

[Claim 10] How to measure abundance of a particular group or a specific bacillus in a compound microorganism system or a symbiotic-microorganisms system adding a nucleic acid probe of a couple given in any 1 paragraph of Claims 1-7 in cytoclasis liquid of a compound microorganism system or a symbiotic-microorganisms system.

[Claim 11] A way a compound microorganism system or a symbiotic-microorganisms system measures abundance of a particular group or a specific bacillus in the compound microorganism system according to claim 9 or 10 or a symbiotic-microorganisms system which is a useful material production culture system.

[Claim 12] A way a compound microorganism system or a symbiotic-microorganisms system measures abundance of a particular group or a specific bacillus in a compound microorganism system or a symbiotic-microorganisms system

given in any 1 paragraph of Claims 9-11 which are useful material production culture systems by consisting of the number of strains of 1-22.

- [Claim 13] 16SrRNA of a microorganism which exists in a compound microorganism system or a symbiotic-microorganisms system, How to measure abundance of a particular group or a specific bacillus in a compound microorganism system or a symbiotic-microorganisms system given in any 1 paragraph of Claims 9-12 which are what a base sequence of 23SrRNA or those genes is solved as.

---

[Translation done.]

**\* NOTICES \***

JPO and INPIT are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

1. This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
2. \*\*\*\* shows the word which can not be translated.
3. In the drawings, any words are not translated.

---

**DETAILED DESCRIPTION**

---

[Detailed Description of the Invention]

[0001]

[Field of the Invention] This invention relates to the method of measuring the abundance of the particular group or specific bacillus in the compound microorganism system or symbiotic-microorganisms system which uses the nucleic acid probe of a couple, and its probe. Hybridization is especially carried out to 16SrRNA, 23SrRNA, or gene DNA of those of a microorganism, FISH (fluorescence in.) situ hybridization — it is related with the method of measuring the abundance of the particular group or specific bacillus in the compound microorganism system or symbiotic-microorganisms system using a nucleic acid probe and its probe of the couple which carried out the sign by the fluorochrome molecule of the couple which can be used for law.

[0002]

[Description of the Prior Art] These days, the method of producing special material using a compound microorganism system attracts attention (Beppu: collection [ of the Heisei 10(1998) agricultural chemistry meeting convention lecture gists ]; 120page; Heisei 10(1998) April 3, Nagoya University). It is from expectation whether what was not able to be produced by the microorganism system which consists of the conventional independent microorganism is producible. However, in this system, since the method of analyzing specifically an active mass, a moving state, etc. of a microorganism in a system simple and promptly has not been established yet, it cannot recognize correctly that which microorganism is working how etc. such a situation — the \*\* concerned — the actual condition is not having yet generalized functional development of a microorganism system [ like ].

[0003] A deep sea chemosynthesis symbiosis system (tube worm symbiosis system), the endosymbiosis microorganism system of an insect, Research of a microorganism system which cannot isolate and cultivate each microorganisms, such as a symbiosis system in termite intestines and a symbiosis system of trees and an ectotrophic mycorrhizal fungus, is capturing the spotlight (protein, nucleic acid, and an enzyme; 1217-1253 pages, 43 volumes, 1998). Since each microorganism cannot be isolated and cultivated, the method of specific and measuring that it is simple and promptly has been a problem also in these fields about the abundance of the microorganism.

[0004] Conventionally measurement of the abundance of the particular group or specific bacillus in the above compound microorganism systems and a symbiotic-microorganisms system, The probe of the piece which carries out hybridization to 16SrRNA, 23SrRNA, or gene DNA of those is produced, One fluorochrome is carried out to the arbitrary positions of the probe using the FISH (fluorescence insitu hybridization) method which carries out a sign (Arch.Microbiol., 168 volumes, 185-192 pages, 1997).

[0005] Recently, the method called the molecule beacon (molecular beacon) method for the ability to obtain a quantitive result in a short time (about 12 hours) was proposed (Applied and Environmental Microbiology; 63 volumes). 1143-1147 pages, 1997. The molecule beacon used by the method concerned is a kind of nucleic acid probe which carried out the sign by the fluorochrome molecule, and it is the feature to have the arraying structure in which the both ends of an oligonucleotide carry out complementary mutually. For the structure, stem structure can be taken by both ends and loop structure can be taken in the center section. The KUENKYA substance which eliminates a fluorochrome to one side of both ends, and eliminates the fluorescence on another side is combined. If the probe concerned is independent in a solution, stem loop structure is taken, and a fluorescence color is not emitted, but when the Polymer Division nucleic acid which can start hybridization exists, hybridization is carried out to the Polymer Division nucleic acid concerned, and stem structure breaks. As the result, it comes to emit a fluorescence color peculiar to a fluorochrome. The purpose can be attained by measuring the intensity of the fluorescence color.

[0006] In the aforementioned FISH method, since the unreacted nucleic acid probe existed in the system of measurement, the trap of the nucleic acid probe which carried out hybridization to target-nucleic-acid arrangement was carried out to suitable base materials, such as a membrane filter, and operation of removing an unreacted nucleic acid probe by washing etc. was needed. And means to calculate the microbial cell which a trap is carried out to a base material, and shows a fluorescence under a fluorescence microscope were taken. This needed a serious labor and perseverance. The number of bases of the probe needed to be at least 15 or more from the singularity of hybridization. When such a long probe was used, the penetrable problem of the cell membrane had arisen. In order to solve this problem, the microorganism needed to be performed for physical processings of chemical preparation, such as an enzyme, an organic solvent, or a surface-active agent, or an ultrasonic wave, or those concomitant use processings.

[0007] A solution can perform the molecule beacon method, and also it has the strong point in which a result is

obtained in a short time of 12 hours. However, since this probe has a fluorochrome molecule and a KUENKYA substance in the both ends of one oligonucleotide and it has a base sequence which carries out hybridization to objective nucleic acid, a molecular weight will become big considerably. Therefore, the range of an applicable microorganism had the problem that it was limited, from the problem of cell membrane permeability of the oligonucleotide concerned. In the culture system from which a compound microorganism system or a symbiotic-microorganisms system changes every moment also in a short time of 12 hours, it is by no means useful.

[0008] A probe by which is a thing of the length about the half of the shortest possible probe, i.e., the probe of the various above-mentioned methods, and the sign was carried out to the probe with the coloring matter of the piece from the above-mentioned situation was desired. Remove a probe unreacted when a probe carries out hybridization to target-nucleic-acid arrangement from a system of measurement, or, The abundance of the particular group or the specific bacillus was requested [ in / in not using a microscope etc., either / the compound microorganism system or the symbiotic-microorganisms system ] from simple and the specific method of measuring in 1 thru/or about 3 hours. It is a culture system of a compound microorganism system or a symbiotic-microorganisms system which consists of two or more microorganisms, and is because the necessity of controlling the microflora in a system is imminent in order to raise a production yield, when producing useful material. That is, after culture is completed, in the analysis of a microflora, it is too late.

[0009]

[Problem(s) to be Solved by the Invention]. In view of the above-mentioned situation, simple [ specific ], probe which can be measured in a short time, and it were used for SUBJECT of this invention for the abundance of the particular group or the specific bacillus in the compound microorganism system or the symbiotic-microorganisms system. In a compound microorganism system or a symbiotic-microorganisms system, they are simple and a specific thing for which the method of measuring for a short time is provided about the abundance of a particular group or a specific bacillus.

[0010]

[Means for Solving the Problem] This invention persons consist of two oligonucleotides, as a result of trying hard wholeheartedly in solving said SUBJECT, By a fluorochrome molecule of a couple which can cause a full ORORE sense Resonance energy transfer (Fluorescence Resonance Energy Transfer) (FRET) phenomenon. Are the nucleic acid probe which carried out the sign of each oligonucleotide, and to the purpose base sequence the two nucleic acid probes concerned, When carrying out hybridization, distance between end bases to which two nucleic acid probes face mutually uses the number of bases, and by 0, or 1 thru/or 2. Hybridization was carried out to a target base sequence, and a fluorochrome molecule by which the sign is carried out to a nucleic acid probe thought and resulted in a nucleic acid probe of a couple by which the sign was carried out so that it might be located in distance which generates FRET most effectively. And when a probe of the couple was applied to a method of measuring abundance of a particular group or a specific bacillus in a compound microorganism system or a symbiotic-microorganisms system, knowledge that SUBJECT of this invention could be attained was acquired. This invention is based in this knowledge and completed.

[0011] Namely, this invention is a fluorochrome molecule of a couple which can cause 1 full ORORE sense Resonance energy transfer (Fluorescence Resonance Energy Transfer) (FRET) phenomenon, They are two nucleic acid probes which carried out the sign of the two oligonucleotides which can carry out hybridization to the separate purpose base sequence, So that a fluorochrome molecule by which the sign is carried out to a nucleic acid probe may generate FRET most effectively, when the two nucleic acid probes concerned carry out hybridization to the purpose base sequence, (1) The sign of one side of a fluorochrome molecule of a couple is carried out to one of the end sides which face mutually in two oligonucleotides, . [ whether the sign of one of other fluorochrome molecules is carried out into a chain of one of other oligonucleotides, and ] Or a nucleic acid probe of a couple, wherein the sign of each of a fluorochrome molecule of (2) couples is carried out into each two chains of an oligonucleotide, 2 -- a method of carrying out measurement of nucleic acid, or detection using a nucleic acid probe of said couple of 1, and 3 -- using a nucleic acid probe of said couple of 1 A method of measuring abundance of a particular group or a specific bacillus in a compound microorganism system or a symbiotic-microorganisms system is provided.

[0012]

[Embodiment of the Invention] Next, a desirable embodiment is mentioned and this invention is explained still in detail. This invention is a nucleic acid probe of the couple which consists of two oligonucleotides. An oligonucleotide consists of ornamentation nucleic acid, such as a RIBOKISHI nucleotide, deoxyribonucleotide or 2-methyl-RNA, and DNA, and may be designed carry out hybridization to the target sequence of what kind of nucleic acid. That is, hybridization should just be specifically carried out to the purpose base sequence, and a base sequence in particular is not limited.

[0013] The oligonucleotide of the nucleic acid probe of the couple of this invention can be prepared by the method of using a known method, i.e., a chemosynthesis method, or a commercial nucleic-acid-biosynthesis machine (for example, ABI394 (made by Perkin Elmer)). On the occasion of the composition, a base sequence is designed first. The design of the base sequence is made by performing cloning of target nucleic acid, and base sequence determination. What is necessary is to refer to a suitable compendium and just to perform it, since those art is performed universally now (a new edition microbiology laboratory procedure, Kodansha sign tee FIKU, 239-249 pages, 1999). What is necessary is just to commission there now, since there is a company which takes over composition of an oligonucleotide if even the design of a base sequence is performed. For example, BEKKUSU, Inc., International Reagents Corp., and TAKARA SHUZO CO., LTD. can be mentioned.

[0014]The sign of the nucleic acid probe of the couple of this invention is further carried out by the fluorochrome. The fluorochrome has a fluorochrome molecule of the couple which can cause a full ORORE sense Resonance energy transfer (Fluorescence Resonance Energy Transfer) (FRET) phenomenon. And the sign of the oligonucleotide is carried out. When the nucleic acid probe of the couple of this invention carries out hybridization to the purpose base sequence, the sign of the fluorochrome molecule by which the sign is carried out to the nucleic acid probe is carried out so that it may be located in the distance which generates FRET most effectively. One side of the fluorochrome molecule of a couple carries out the sign of the sign to one of the end sides which face mutually in the oligonucleotide of a couple. One of other fluorochrome molecules may carry out a sign into the chain of one of other oligonucleotide arrays, and the sign of two of the fluorochrome molecules of a couple may be carried out into an oligonucleotide chain. Are more concrete. One of the riboses or deoxyriboses by the side of the end where, as for a sign, one side of the fluorochrome molecule of a couple faces mutually in the oligonucleotide of a couple, for example, Carry out a sign to ornamentation nucleic acid, and Or the nucleobase in the chain of one oligonucleotide of others [ molecules / one / other / fluorochrome ]. A sign may be carried out to (for example, carbon of the 5th place of an amino group, hydroxyl, and a pyrimidine base), and the sign of two of the fluorochrome molecules of a couple may be carried out to the nucleobase (for example, carbon of the 5th place of an amino group, hydroxyl, and a pyrimidine base) in a chain.

[0015]With a pair of fluorochrome molecule which can cause the FRET phenomenon of this invention. In FRET, one side serves as a donor (donor fluorochrome molecule) of energy, and another side means a pair of fluorochrome molecule of the relation which can serve as the receptor (acceptor fluorochrome molecule), and is not limited with concrete illustration. As a donor fluorochrome molecule, for example, the fluorescein (fluorescein), As a full ORESEN isothiocyanate (fluorescein isothiocyanate) (FITC) and an acceptor fluorochrome molecule, x-rhodamine (x-Rhodamine), tetramethylrhodamine isothiocyanate (Tetramethylrhodamine isothiocyanate) (TRITC), CY3 (carbocyanine3), etc. can be mentioned. From light quantity, as a desirable thing, fluorescein and FITC can be mentioned as a donor fluorochrome molecule, and x-rhodamine and TRITC can be mentioned as an acceptor fluorochrome molecule.

[0016]A pair of fluorochrome molecule depends on the kind, molecular size, and shape of a fluorochrome molecule for the distance which can start FRET most. However, generally it is 20-80A. Therefore, it depends for the arraying structure of an oligonucleotide on the kind, molecular size, and shape of a fluorochrome molecule. As a donor fluorochrome molecule, specifically The fluorescence (fluorescence), When rhodamine, TRITC, or CY3 is used as FITC and an acceptor fluorochrome molecule, two to 30 base, the bases by which the sign was carried out by the fluorochrome molecule separate three to 20 base preferably, and they design in base sequence structure carry out hybridization to the target nucleic acid. In this invention, the oligonucleotide by which the sign was hereafter carried out for convenience to the donor probe by the acceptor fluorochrome molecule in the oligonucleotide by which the sign was carried out by the donor fluorochrome molecule is called acceptor probe. And when the nucleic acid probe of the couple of this invention carries out hybridization to objective-nucleic-acid arrangement, the distance between the end bases which face both the probes of a couple is designed by the distance from which the aforementioned FRET phenomenon arises. In this invention, preferably, the distance is made into the number of bases, and is designed be 0, or 1 thru/or 2.

[0017]In order to carry out the sign of the aforementioned fluorochrome into the chain of the oligonucleotide array of the aforementioned couple, it is preferred to use a nucleoside with a pyrimidine base and the nucleoside by which that of the 5th place of the base was embellished with the amino linker as a base for a sign generally, for example. The nucleoside is used and the target oligonucleotide is compounded. An amino linker is embellished with a fluorochrome molecule after composition. Thus, the sign of the base of arbitrary positions can be carried out in a fluorochrome. As for carrying out the sign of the ribose or deoxyribose by the side of the end which faces mutually, since the kit reagent is marketed, it is also convenient to use it. As for the aforementioned composition, it is most convenient to perform commission composition (said company, PerkinElmer Japan Aplite).

[0018]Although the nucleic acid probe of the couple of this invention is prepared as mentioned above, if this probe carries out hybridization to a target base sequence, it will come to show a fluorescence by a FRET phenomenon. However, a target base sequence, mismatch \*\*\*\* of a little salt group, and fluorescence intensity decrease not less than 99% depending on a reaction condition. Therefore, the singularity of the nucleic acid probe of the couple of this invention is very high.

[0019]The hybridization method using the existing FRET phenomenon embellishes the fluorescence molecule of a donor and an acceptor at the end of a nucleic acid sequence separate [ two ]. Therefore, in a conventional method, in order to make a FRET phenomenon cause the optimal, it is necessary to open about about 3-30 bases of two probe intervals when it hybridizes. Therefore, it depends for the determination of the interval of a donor probe and an acceptor probe on the efficiency of FRET inevitably.

[0020]However, the nucleic acid probe of the couple of this invention has the following effects.

(1) One continuous specific sequence is detectable by setting the interval of a donor probe and an acceptor probe to 0, for example. For this reason, the number of bases of the specific sequence restricted from the field of reactivity or singularity so far (about about 8-25 bases) can be doubled (about about 16-50 bases). Therefore, the singularity of detection can be raised by leaps and bounds.

(2) It can be adapted by dividing arrangement into two and embellishing a fluorescent substance in the chain of the probe arrangements of one of the two or both also about the known specific sequence currently used from the former.

(3) When it is used by the method of the above (2), the number of bases of a probe [ even ] of a hit decreases, and the penetrable problem of the cell membrane which poses a problem by the FISH method can be reduced. Since  $T_m$  value of a probe will fall and reactivity with a target will worsen if the usual DNA is used for probe arrangements when the number of bases decreases, What is necessary is just to use ornamentation nucleic acid, such as RNA or 2-o-methyl RNA, and PNA, for probe arrangements, in order to raise  $T_m$  value of probe arrangements and to make reactivity with a target good.

(4) The determination of the probe arrangements of this invention determines only a specific sequence to detect, and should just divide it into two, and it becomes simple probe designing it. In this case, it is good to divide so that  $T_m$  value of two probes may be in agreement because of the improvement in singularity.

(5) Since the thing which lose the portion of a single strand among both probes as mentioned above (or few) and to do is possible, the nucleic acid between a donor and an AKUZEPUTA fluorescent substance sign takes double helix structure. For this reason, the distance of a donor and an acceptor can be specified correctly and this distance cannot change easily due to the nucleic acid sequence of a target. Therefore, the trial-and-error probe development accompanied by an experiment becomes unnecessary.

[0021] Both a donor fluorescent substance, and acceptor both [ one of the two or ] are embellished with this invention in the chain of donor probe arrangement and acceptor arrangement. In size, this point is a point which comes and serves as Lycium chinense with the hybridization method using the existing FRET phenomenon on probe production. For this reason, the ornamentation of a fluorescent substance in the arbitrary positions in a probe-arrangements chain is attained, and even if it obtains with the intervals of donor probe arrangement and acceptor probe arrangements and is zero base, it can be designed so that a FRET phenomenon may most often be seen. Thus, the probe of the couple of this invention can determine the interval of a donor probe and an acceptor probe independently of FRET efficiency.

[0022] The nucleic acid probe of the couple of this invention can be used conveniently for measurement of various nucleic acid, and detection. By designing carry out hybridization to 16SrRNA, 23SrRNA, or gene DNA of those of eukaryote or a procaryote specifically especially, The abundance of the particular group or specific bacillus in a compound microorganism system or a symbiotic-microorganisms system can be measured suitably.

[0023] a compound microorganism system is a system in which at least two or more sorts of microorganisms are intermingled in this invention -- the system -- a growth state or a bacteriostasis state -- whichever may be sufficient. More specifically, it is a thing etc. of culturing conditions and the state of the very thing produced by extracting from suspended state voice or directly a natural ecosystem to buffer solution. Not each microorganism which exists in the system asks the right or wrong of isolation and culture. A symbiotic-microorganisms system is a system which has a microorganism more than a kind in living things and coexistence states other than a microorganism at least. Like the above, even if it can isolate and cultivate each microorganism which exists in the system, it does not have to be made.

[0024] A microorganism is a generally said microorganism and it is not limited in particular. For example, a eucaryotic microorganism, a prokaryon microorganism, other mycoplasmas, a virus, RIKKECHA, etc. can be mentioned. A particular group or a specific bacillus is a strain which wants to investigate how it is playing an active part in the aforementioned system.

[0025] Although the compound microorganism system and symbiotic-microorganisms system which can apply the nucleic acid probe of the couple of this invention are defined as mentioned above, the microbial contamination system in the following systems can specifically be mentioned. for example, 4 food-microorganism contamination system (microbial contamination inspection) and the brewing system (the wine using yeast,) which uses 5 several-kinds microorganisms 6, such as alcohol productions, such as beer, sake, and white distilled liquor, vinegar production using acetic acid bacteria, and yeast production using mold, -- the various useful material production systems (amino acid using the matter production and the bacteria using a ray fungus, or nucleic acid related compound production.) which use various microorganisms in addition to this.

The microorganism which produces toxic substances, such as a toxin called saprophytic bacteria from the outside of a system, and the microorganism which checks production of useful material pollute with these systems. And it is the necessity of measuring the abundance of saprophytic bacteria promptly. The whole system of saprophytic bacteria is a compound microorganism system with a specific groove or a specific bacillus. For example, in a food contamination system, the purpose can be attained by measuring the abundance of the whole mold, the whole yeast, or the whole bacteria. Those bacilli are a specific groove or a specific bacillus. Since yeast production by mold is performed by a open system, contamination worsens quality of yeast. In this case, bacteria are a specific groove or a specific bacillus, and the whole yeast is a compound microorganism system. In such a useful material production system (compound microorganism system), the nucleic acid probe of the couple of this invention is extremely helpful to measurement in the abundance of saprophytic bacteria (a specific groove or a specific bacillus).

[0026] In this invention, the suitable system can mention the system the concrete bacillus name of the bacillus which exists in a system is proved that it is. And they are 16SrRNA of the bacillus which exists in a system more suitably, 23SrRNA, or the system as which the base sequence of those genes is solved. And it is the system which produces useful material by working together of two or more bacilli. If the microflora (abundance ratio of a bacillus) in a system is not controlled, it is a system whose yield of production of useful material does not improve. In such a case, it is necessary to measure the abundance ratio of a bacillus within at least 1 to 3 hours. especially -- the kind (the number of strains: kind of bacillus which makes the same the base sequence of 16SrRNA and 23SrRNA) of bacillus of the microorganism in a system -- desirable -- 2-22 -- it is 2-10 more preferably. If 22 is exceeded, the

interaction of a microorganism is complicated and is not suitable for production of actual useful material. As the example, by the compound microorganism system (called R-3 bacillus.) which consists of *Agrobacterium*, *Acetobacter*, *Oerskovia*, and *Entrobacter*. A viscous-materials (APR-3) production system (Biosci.Biotech.Biochem., 58 (9) volumes, 1589-1594 pages, 1994) etc. can be mentioned.

[0027] In this invention, the particular group of a compound microorganism system refers to the gram positive bacteria in the system in which the prokaryon microorganism in the compound microorganism system in which the eucaryotic microorganism and the prokaryon microorganism are intermingled, and the prokaryon microorganism are intermingled, for example. In the compound microorganism system which produces useful material, a specific bacillus is a bacillus which is influencing the yield of production of useful material as shown above. However, this invention is not limited with the above-mentioned example.

[0028] In this invention, the nucleic acid probe of the couple of this invention is added to a compound microorganism system, a symbiotic-microorganisms system, especially its cell lineage, the time of the nucleic acid probe of a couple carrying out hybridization to a target base sequence, when the abundance of a particular group or a specific bacillus is measured — the sum total of the number of bases of a target base sequence — 16 to 50 — it is 20 to 40 preferably. and one nucleic acid probe of a couple — 8 to 25 — it is 10 to 20 preferably. When the number of bases is 25 or more, the permeability of the cell of a nucleic acid probe worsens, and when it is seven or less, the singularity of hybridization worsens, and it stops and showing the actual abundance of a microorganism.

[0029] When adding the nucleic acid probe of a couple in a compound microorganism system and a symbiotic-microorganisms system and measuring the abundance of a particular group or a specific bacillus, the base sequences of the nucleic acid probe differ by whether the abundance of a specific groove is measured, or the abundance of a specific bacillus is measured. In this case, since hybridization of the nucleic acid probe of the couple of this invention is specifically carried out to the specific sequence of 16SrRNA of eukaryote or a procaryote, 23SrRNA, or gene DNA of those. What is necessary is just to use the arrangement (namely, common arrangement) well saved among particular groups in 16SrRNA, 23SrRNA, or gene DNA of those, when measuring the abundance of a specific groove. Now, the base sequence of 16SrRNA in a microorganism, 23SrRNA, or gene DNA of those is determined. And the arrangement and the non-conserved sequence which are well saved between Momma and a group and between seeds are determined, and it is used for identification of a microorganism. This method is making the mainstream of identification of a microorganism. Then, the base sequence of the nucleic acid probe of the couple of this invention can be set up easily. What is necessary is just to specifically search data bases, such as EMBL, GenBank, DDJB, and RDP (document name: the directions of the database of a genome network, KYORITSU SHUPPAN, 1996).

[0030] For example, if the probe which carries out hybridization to the arrangement of the following well saved to the prokaryon microorganism is used, the abundance of a prokaryon microorganism can be measured in the compound microorganism system which consists of a eucaryotic microorganism and a prokaryon microorganism.

1(X'5')TCT CAA ACT AGG ACC GAG TC(3')

2(X'5')ATT GTG TAC GTT CAG CTT GC(3')3(X'5')GAT GCG CTC CGT CGT CAC CC (3')4(X'5')GGG TGA CGA CGG AGG GCA TC(3')

5 (5') GTC GTC GGC GCC. ATT ATG6(3')(5') CAT. AAT GGC GCC GAC GAC(3') 7 (5') TTT GAG TTT CCT TAA CTG CC(3') 8 (5') GGC AGT TAA GGA AAC TCA AA(3') 9(5')GTA. CCG ACA GCA GTC GAG CA(3')

10) (5') — TGC TCG ACT GCT GTC GGT AC (3') — suitably the thing of these 11 (5') TGC CCG CCA CAC ATG (3') 12 (5') TTC CTC CAC TAG GTC GGC GT (3'). The above 5, 6, and 11 etc. can be mentioned.

[0031] Such is carried out, and during the arrangement of those other than the aforementioned base sequence, since a specific bacillus has specific arrangement, according to a bacillus, the base sequence of the probe for specific bacilli is set up. When the concrete microorganism of a certain compound microorganism system does not become clear, nucleic acid is extracted from a compound microorganism, 16SrRNA, 23SrRNA, or gene DNA of those is amplified by the PCR method, the nucleic acid contained in the system is separated, and the arrangement is determined. In 16SrRNA, since it is a base sequence of 1500 - 1700bp grade at the maximum, by the present state of the art, it can opt for the whole base sequence easily (). [ Nucleic Acid Research and ] 17 volumes, 7843-7853 pages, 1989; A new edition microbiology laboratory procedure, 203-289 pages, 1999, Kodansha SAIENTIFIKU. If you carry out analysis commission, it is convenient for International Reagents Corp. 1000 bases are analyzed by one operation.

[0032] A base sequence is set up as mentioned above and a pair of nucleic acid probe of this invention is prepared. From the aforementioned thing, a pair of nucleic acid probe of this invention is added in a compound microorganism system or a symbiotic-microorganisms system. After carrying out hybridization to 16SrRNA, 23SrRNA, or gene DNA of those of a particular group or a specific bacillus. The intensity of a fluorescence color or the fluorescence intensity ratio of a donor fluorochrome and an acceptor pigment to generate will be measured, and the abundance of a particular group or a specific bacillus will be measured. In this invention, although it is applicable to the viable cell system of a compound microorganism system or a symbiotic-microorganisms system. It adds with the nucleic acid probe of this invention to the homogenate of a cell as well as the cell which received physical processing of various various enzyme treatment and chemical agent processings, various surfactant treatment, an ultrasonic wave (sonic), cell crushing, etc., etc.. The method of measuring the intensity of the fluorescence color to generate and measuring the abundance of a particular group or a specific bacillus is also a more suitable method.

[0033] The aforementioned measuring method is the same as that of methods, such as the conventional molecule beacon method (Applied and Environmental Microbiology;63 volume, 1143-1147 pages, 1997). For example, it is as the following. Before adding a nucleic acid probe, buffer solution etc. adjust pH of a system of measurement to around



seven (neutral vicinity).

[0034]the particular group or specific bacillus in a compound microorganism system or a symbiotic-microorganisms system -- as a cell number -- a  $10^6 - 10^8$  individual / ml -- it is suitable although preferably adjusted to a  $10^7$  individual / ml. It can be performed by concentration by dilution or centrifugal separation, etc. When a cell number is less than a  $10^6$  individual / ml, the intensity of a fluorescence color is weak and an error of measurement becomes large. Since the fluorescence intensity of a compound microorganism system or a symbiotic-microorganisms system is too strong, it becomes impossible to measure the abundance of a specific microorganism quantitatively, when exceeding a  $10^8$  individual / ml. When cell mass concentration is deep, corresponding by dilution is possible.

[0035]It depends on the cell number of the particular group or specific bacillus in a compound microorganism system or a symbiotic-microorganisms system for the concentration of the donor nucleic acid probe to add. as opposed to cell number  $1 \times 10^8$  / ml -- 0.5 - 2.0nM concentration -- it is 1.0nM concentration preferably. At the time of less than 0.5, it does not become the data which reflected correctly the abundance of the microorganism of a particular group or a specific bacillus. And it is preferred to add an acceptor nucleic acid probe at a rate of 1.5 - 2.5nM preferably one to 4 nM to donor nucleic-acid-probe 1nM concentration. When an acceptor nucleic acid probe is less than 1 nM to donor nucleic-acid-probe 1nM concentration, in order that the probe of a couple may not carry out hybridization to a target thoroughly, the fluorescence intensity of the system concerned becomes smaller than the abundance of the microorganism of a actual particular group or a specific bacillus. When exceeding 4nM, it becomes superfluous [ an acceptor nucleic acid probe ], and becomes futility.

[0036]When carrying out hybridization to 16SrRNA, 23SrRNA, or gene DNA of those of the nucleic acid probe of this invention, a particular group, or a specific bacillus, next, reaction temperature,  $T_m$  value of  $**10**$  of the hybridization thing which carried out hybridization to the specific part of a donor nucleic acid probe, the 16SrRNA concerned, 23SrRNA, or gene DNA of those sets  $**5**$  as  $**2**$  preferably especially. Nonspecific hybridization can be prevented by this. At the time below  $T_m - 10**$ , when exceeding a nonspecific hybridization cause and  $T_m + 10**$ , hybridization does not happen.  $T_m$  value can be calculated in the experiment which designs the nucleic acid probe of this invention. Chemosynthesis of the oligonucleotide of the complementary arrangement which carries out hybridization to the nucleic acid probe concerned is carried out with a nucleic-acid-biosynthesis machine etc., and  $T_m$  value of a hybridization thing with the nucleic acid probe concerned is measured by the usual method. The reaction time is for 60 to 90 minutes preferably for 30 to 180 minutes. At the time of for less than 30 minutes, hybridization becomes unreacted. Since the nucleic acid probe of this invention comes to combine also with the arrangement of those other than the purpose arraying structure when exceeding for 180 minutes, an error of measurement becomes large.

[0037]It is also possible to fix the biomass after performing hybridization by the method mentioned above besides the above-mentioned method on a slide glass or a membrane filter, and to perform microscope observation, and it is possible to acquire the information on the cell number and percentage of a stricter composition bacillus in this case. The method of the immobilization to up to a slide glass is shown below. The biomass suspension hybridization processed [ above-mentioned ] is put on the slide glass in which gelatin coating of about 1microl and the eight holes was carried out. This is dried and it observes under an incident-light fluorescence microscope. If the probe designed with the thought of this method is used, only target 16SrRNA or 23SrRNA in biomass crushing liquid are detectable. Since it can carry out clear [ of the problem of a probe penetration ] by carrying out biomass crushing, it is dramatically effective when the permeability of a probe targets a bad bacillus.

[0038]After carrying out hybridization of the nucleic acid probe of this invention to 16SrRNA, 23SrRNA, or gene DNA of those of a particular group or a specific bacillus on the above conditions, the intensity of the fluorescence color in which a compound microorganism system or a symbiotic-microorganisms system colors will be measured. In this case, if the fluorochrome molecule of a donor nucleic acid probe is excited with a specified wavelength, when an acceptor nucleic acid probe exists, the coloring intensity of a donor fluorochrome molecule decreases and the fluorescence intensity of an acceptor nucleic acid probe increases.

[0039]The intensity of the fluorescence color measured as mentioned above is proportional to the abundance of the particular group or specific bacillus in a compound microorganism system or a symbiotic-microorganisms system. That is because the abundance of the quantity of 16SrRNA, 23SrRNA, or gene DNA of those, a particular group, or a specific bacillus is proportional.

[0040]Ingredients other than a microorganism [ in / on this invention and / a compound microorganism system ], It is not limited, unless hybridization with 16SrRNA of the nucleic acid probe of this invention, a particular group, or a specific bacillus, 23SrRNA, or gene DNA of those is checked, or unless coloring of a FRET phenomenon and a fluorescence color is checked. For example,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , Inorganic nitrogen, such as phosphates, such as  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , ammonium sulfate, an ammonium nitrate, and urea. Various salts, such as sulfate of trace element ion, such as various salts of ion, such as magnesium, sodium, potassium, and calcium, manganese, zinc, iron, and cobalt, chloride, and carbonate, and also vitamins may be contained suitably. What is necessary is to separate the biomass in which two or more microorganisms are intermingled by operation of centrifugal separation etc., and to just be again suspended in a buffer solution system etc., when the above-mentioned inhibition is observed.

[0041]As the above-mentioned buffer solution, various buffer solution, such as a phosphate buffer solution, carbonic acid buffer solution, tris and chloride buffer solution, Tris Grishin buffer solution, citrate buffer solution, and GUTTO buffer solution, can also be used. The concentration of buffer solution is hybridization, a FRET phenomenon, and concentration that does not check fluorescence coloring. It depends for the concentration on the kind of buffer

solution. the pH of buffer solution — 4-12 — it is 5-9 preferably.

[0042]

[Example] Next, working example and a comparative example are given and this invention is explained still more concretely.

Working example 1 *Escherichia coli* (*Escherichia*.) The nucleic acid probe of the couple of this invention which is counted from 5' end of 16SrRNA of *coli*, and carries out hybridization to 338 to 355th nucleic acid base sequence (5') ACU CCU ACG GGA GGC AGC (3') was prepared. The above-mentioned arrangement is known as a group specific sequence of an eubacterium.

1) Nucleic-acid-probe: (5') GCT GC(FITC) CTCC (3') which counted from the donor nucleic-acid-probe 5' end, and carried out the sign of the carbon of the 5th place of the 5th cytosine base by FITC was prepared. In order that the amino group of SHICHIJISHIN may raise reaction temperature as cytosine which carries out a sign, using what was embellished with the amino linker (it purchases from Kem Jeanne, Inc.), The nucleoside except carrying out a sign by FITC compounded the oligonucleotide of said base sequence using DNA synthesis machine ABI394 (made by Perkin Elmer) using the ribonucleoside formed into 2-O-Methyl. After compounding the oligonucleotide concerned, the sign of the amino linker which was counted from 5' end and combined with carbon of the 5th place of the 5th cytosine base was carried out by FITC. NAP-25 column (Pharmacia manufacture) performed the gel filtration for the reactant concerned, and unreacted FITC was removed. Furthermore, opposite phase HPLC (B gradient: for 15 to 65% and 25 minutes) was performed on condition of the following. And the main peak eluted near holding time (retention time: RT) 20 minute was isolated preparatively. The fraction isolated preparatively was freeze-dried and one donor nucleic acid probe of the couple of this invention, i.e. (5'), GCT GC(FITC) CTC C33(3') microg, was obtained.

[0043] opposite phase KUTOMATO — gruffy solvent B: 0.05N TEAA 40%CH<sub>3</sub>CN column for condition: elution solvent A: 0.05N TEAA 5%CH<sub>3</sub>CN gradients: — CAPCEL PAK C<sub>18</sub>: 6x250-mm rate-of-dissolution: — 1.0 ml/min

temperature: — 40 °C detection: — 254 nm [0044] 2) The nucleic acid probe which carried out the sign of the amino group of the cytosine base (5' the end side to 3rd thymine base) in the chain by the side of the preparation 3' end of an acceptor nucleic acid probe by TRITC: (5') CGT(TRITC) AGG AGT (3') was prepared. In order to raise reaction temperature, the ribonucleoside formed into 2-O-Methyl was used for the nucleoside except carrying out a sign by TRITC. That (Kem Jeanne, Inc.) with which the amino linker of C-5 was embellished by the 5th place of the base was used for the thymine which carries out a sign by TRITC. The acceptor nucleic-acid-probe arrangement of the oligonucleotide of said arrangement, i.e., this invention, was compounded using DNA synthesis machine ABI394 (made by Perkin Elmer) using these nucleosides. The sign of the amino linker of thymine located in the 3rd from a five prime end was carried out by TRITC after compounding probe arrangements. Refining was performed by the same method as said donor nucleic acid probe.

[0045] Concussion culture of 109 shares of *Escherichia coli* JM was carried out at 37 °C overnight using the Erlenmeyer flask of 200-ml containing 50 ml (presentation: NB, 0.08g/100 ml) of working example broth [ NYUTORIENTO ] (NB) (made by Difco) liquid media sterilized two times. 1 ml of culture medium was centrifuged with the Eppendorf centrifugal tube of 1.5-ml capacity, and the biomass was obtained. The biomass was washed once by 100micro of 30mM phosphate buffer solution (specific salt) (pH: 7.2) l. The biomass was suspended to said phosphate buffer solution 100mul of 130mM NaCl content. The suspension concerned was under ice-cooling, it ultrasonicated for 40 minutes (output: 33W, oscillating frequency: 20kHz, the oscillating method: 0.5-second oscillation 0.5-second pause), and the homogenate was produced.

[0046] After centrifuging said homogenate, supernatant liquor was extracted and it moved to the cell of a fluorophotometer. Temperature control of it was carried out to 36 °C. The aforementioned donor who warmed beforehand at 36 °C, and 50micro of each solutions (as a DNA, a donor probe is 0.35ng/mul and an acceptor probe is 0.18ng/mul as a DNA) l of the acceptor nucleic acid probe were added, buffer solution was added further, and the whole quantity was 2 ml. Hybridization of *Escherichia coli* 16SrRNA and the nucleic acid probe of this invention was carried out for 90 minutes, carrying out temperature control to 36 °C. It measured with the fluorophotometer after 90 minutes (excitation light: FITC, measurement fluorescence color: 580nm). The result was shown in drawing 1. Between cell mass O.D.660 and the intensity of a fluorescence color, proportionality was expected for drawing 1 to show.

[0047] The culture medium same to the biomass of *Escherichia coli* JM109 obtained in working example 3 working example 2 as working example 2, The said concentration mixing of the biomass of the *Pseudomonas* POUCHIMOBIRUSU 421Y stock (*Pseudomonas paucimobilis*) (present name; *Sphingomonas* POUCHIMOBIRUSU) (FERM P-5122) prepared by the culture condition was carried out, and the compound microorganism system was prepared. About the obtained mixed liquor (the cell mass concentration of 109 shares of *Escherichia coli* JM is the same as that of working example 2), the homogenate was prepared by the same method as working example 2. The donor who shows below the homogenate concerned, and the acceptor nucleic acid probe were added like working example 2, and it measured by the same method as working example 2. The used probe used the probe of the arrangement of the specific following for the gamma subclass of the PUROTEO bacteria of 109 shares of *Escherichia coli* JM which belong. Target base sequences are 23SrRNA. Production of the probe was performed by the same method as working example 1.

— donor nucleic-acid-probe: (5') — GCC T(FITC) TCC C (3') and acceptor nucleic-acid-probe: (5') — the ACA TC (TRITC) GTT T (3') result was in agreement with drawing 1 shown in working example 2. Also in the system which two or more sorts of microorganisms compound by this, only the target microbe was detected specifically, and it succeeded in measuring that abundance. In this example of an experiment, the time from extraction \*\*\*\*\* to

measuring finish was 2 hours about the biomass from culture medium.

[0048]the both ends of the oligonucleotide of the same base sequence as example of comparative experiments 1 working example 3 — 5'-CCCCC — a base sequence and GGGGG-3' — the oligonucleotide which added the base sequence was prepared like working example 1. the method (Applied and Environment Microbiol., 63 volumes, 1143-1147 pages, and 1997) of this oligonucleotide to P. Schofield and others — it applied correspondingly and the molecule beacon was produced. dabcy-N-hydroxysuccinimide was combined with the three-dash terminal as a quencher, and FITC was combined with the five prime end as a photogen. High BURIDAI ZESHONSHI was carried out like working example 3 except using the molecule beacon concerned. In this case, the cell mass OD<sub>660</sub> value performed hybridization by 0.6. As a result of measuring time until fluorescence intensity is balancing, it became like drawing 2. 10 hours was taken to be balancing.

[0049]As a result of measuring time until fluorescence intensity is balancing like the example 1 of comparative experiments using the nucleic acid of the couple of this invention of working example 4 working example 3, it became like drawing 2. 60 minutes was taken to be balancing. thus, fluorescence intensity — a balance — the time of until is very short. As for this, it is considered to be the cause that the probe of the couple of this invention does not take secondary structure within a probe unlike a molecule beacon. And this phenomenon shows that the purpose of this invention can be attained in a short time.

[0050]The relation of the base mismatch and fluorescence intensity in the hybridization of the nucleic acid probe of the couple of working example 5 this invention and a target base sequence was considered. The oligonucleotide which has the following base arrangement as a target base sequence was compounded like working example 1. What was used in working example 3 was used as a nucleic acid probe of the couple of this invention.

A: (5') AAA CGA TGT GGG AAG GC (3') (with the nucleic acid probe of the couple of this invention, and no mismatch)

B: (5') AAA G\*GA TGT GGG AAG GC (3') (the nucleic acid probe and those with 1 base mismatch of a couple of this invention.)

C: (5') AAA G\*GA TGT GGG AT\*G GC (3') (the nucleic acid probe and those with 2 base mismatches of a couple of this invention.)

However, the above-mentioned \* seal is a mismatch base.

[0051]nucleic-acid-probe donor probe [ of the couple of Experimental condition (1) Cell mass OD<sub>660</sub>:0.6 (2) this invention ]: — 4nM acceptor probe: — 16nM (3) hybridization time: — 90-minute hybridization [ (4) ] temperature: — 36 °C (5) experiment operation: — working example 2 — the same .

The experimental result was shown in Table 1.

[0052]

表1 塩基のミスマッチと蛍光強度の関係

塩基配列	蛍光強度	比
A	20	1
B	0.15	0.0075
C	0.05	0.0025

The nucleic acid probe of the couple of this invention is understood that singularity is high from Table 1.

[0053]

[Effect of the Invention]As mentioned above, the nucleic acid probe of the couple of this invention has the following effects.

- (1) One continuous specific sequence is detectable by setting the interval of a donor probe and an acceptor probe to 0, for example. For this reason, the number of bases of the specific sequence restricted from the field of reactivity or singularity so far (about about 10-25 bases) can be doubled (about about 20-50 bases). Therefore, the singularity of detection can be raised by leaps and bounds.
- (2) It can be adapted by dividing arrangement into two and carrying out fluorescent substance ornamentation into the chain of the probe arrangements of one of the two or both also with the known specific sequence currently used from the former.
- (3) When it is used by two methods, the number of bases of a probe [ even ] of a hit decreases, and the penetrable problem of the cell membrane which poses a problem by the FISH method can be reduced.
- (4) The determination of the probe arrangements of this invention determines only a specific sequence to detect, and should just divide it into two, and it becomes simple probe designing it.
- (5) Since the thing which lose the portion of a single strand among both probes as mentioned above (or few) and to do is possible, the nucleic acid between a donor and an AKUZEPUTA fluorescent substance sign takes double helix structure. For this reason, the distance of a donor and an acceptor can be specified correctly and this distance cannot change easily due to the nucleic acid sequence of a target. Therefore, the trial-and-error probe development accompanied by an experiment becomes unnecessary.

[0054]specific in the abundance of the particular group or specific bacillus in a compound microorganism system or symbiotic microorganisms, when the nucleic acid probe of the couple of this invention is used — it can measure simple and promptly.

---

[Translation done.]

**\* NOTICES \***

JPO and INPIT are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

- 1.This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
- 2.\*\*\* shows the word which can not be translated.
- 3.In the drawings, any words are not translated.

---

**DESCRIPTION OF DRAWINGS**

---

[Brief Description of the Drawings]

[Drawing 1]The figure showing the relation of the intensity of the cell mass in the hybridization of the nucleic acid probe of this invention, and Escherichia coli 16SrRNA, and a fluorescence color.

[Drawing 2]The figure showing change of the fluorescence intensity in the hybridization reaction using the nucleic acid probe of the couple of this invention.

---

[Translation done.]

(19) 日本国特許庁 (J P)

## (12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2000-184894

(P2000-184894A)

(43) 公開日 平成12年7月4日(2000.7.4)

(51) Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	テーマコード(参考)
C 1 2 N 15/09	Z N A	C 1 2 N 15/00	Z N A A
C 1 2 Q 1/04		C 1 2 Q 1/04	
1/68		1/68	A
G 0 1 N 21/78		G 0 1 N 21/78	C
33/58		33/58	A
審査請求 未請求 請求項の数13 O L (全 11 頁)			

(21) 出願番号 特願平11-292861

(22) 出願日 平成11年10月14日(1999. 10. 14)

(31) 優先権主張番号 特願平10-293794

(32) 優先日 平成10年10月15日(1998. 10. 15)

(33) 優先権主張国 日本 (J P)

(71) 出願人 597031070

財団法人 バイオインダストリー協会

東京都中央区八丁堀 2-26-9

(74) 上記1名の代理人 100077698

弁理士 吉田 勝広

(71) 出願人 000001144

工業技術院長

東京都千代田区蔵が関 1 丁目 3 番 1 号

(74) 上記1名の復代理人 100077698

弁理士 吉田 勝広 (外1名)

(71) 出願人 000156581

環境エンジニアリング株式会社

東京都千代田区東神田 - 丁目 9 番 8 号

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 一対の核酸プローブおよびそのプローブを用いる複合微生物系または共生微生物系における特定グループ若しくは特定菌の存在量を測定する方法

## (57) 【要約】

【課題】 複合微生物系又は共生微生物系において特定菌株の存在量を特異的にそして簡便かつ迅速に測定する核酸プローブを提供すること。

【解決手段】 複合微生物系等における特定菌株の16SrRNA又は23SrRNA又はその遺伝子DNAにハイブリダイゼーションし且つ蛍光色素分子で標識した核酸プローブを用いて、当該系における特定菌株の存在量の測定方法において、二つのオリゴヌクレオチドの夫々にFRET現象を起こし得る一対の蛍光色素分子で標識した一対の核酸プローブで且つ16SrRNA又は23SrRNA又はその遺伝子DNAに当該二つの核酸プローブがハイブリダイゼーションした際、核酸プローブに標識されている蛍光色素分子が、FRETを最も効果的に発生する距離に位置するように設計された一対の核酸プローブを用いる複合微生物系等の特定菌の存在量を測定する方法。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 フルオロレセンス・レゾナンス・エネルギー・トランスファー (Fluorescence Resonance Energy Transfer) (FRET) 現象を起こし得る一対の蛍光色素分子で、別々の目的塩基配列にハイブリダイゼーションできる二つのオリゴヌクレオチドを標識した二つの核酸プローブであり、目的塩基配列に当該二つの核酸プローブが、ハイブリダイゼーションする際、核酸プローブに標識されている蛍光色素分子がFRETを最も効果的に発生するように、1) 一対の蛍光色素分子の一方が、二つのオリゴヌクレオチドにおいて相互に向き合う末端側のどちらか一方に標識されており、他の一方の蛍光色素分子が他の一方のオリゴヌクレオチドの鎖中に標識されているか、または、2) 一対の蛍光色素分子の各々が、二つのオリゴヌクレオチドの各々の鎖中に標識されていることを特徴とする一対の核酸プローブ。

【請求項2】 一対の核酸プローブに標識された一対の蛍光色素分子の一つが、FRETにおいてエネルギーを与える蛍光色素分子 (ドナー蛍光色素分子) であるフロオレセイン (fluorescein) またはフルオレセインイソチオシアネート (fluorescein isothiocyanate) (FITC) で、他方が当該エネルギーを受け取る蛍光色素分子 (アクセプター蛍光色素分子) であるx-ローダミン (x-Rhodamine)、テトラメチルローダミンイソチオシアネート (Tetramethylrhodamine isothiocyanate) (TRITC) またはCY3 (carbocyanine 3) である請求項1に記載の一対の核酸プローブ。

【請求項3】 一対の核酸プローブが目的核酸配列にハイブリダイゼーションしたとき、相互に向き合う末端塩基間の距離が塩基数にして0または1ないし2である請求項1に記載の一対の核酸プローブ。

【請求項4】 一対の核酸プローブが真核生物若しくは原核生物の16S rRNA若しくは23S rRNAまたはその遺伝子DNAに特異的にハイブリダイゼーションするものである請求項1～3の何れか1項に記載の一対の核酸プローブ。

【請求項5】 一対の核酸プローブが標的塩基配列にハイブリダイゼーションしたとき、一対の核酸プローブの塩基数の合計が16から50である請求項1～4の何れか1項に記載の記載の対の核酸プローブ。

【請求項6】 下記の塩基配列からなる標的核酸配列に、一塩基のミスマッチもなく、ハイブリダイゼーションする請求項1～5の何れか1項に記載の一対の核酸プローブ。

- 1) (5')TCT CAA ACT AGG ACC GAG TC(3')
- 2) (5')ATT GTG TAC GTT CAG CTT GC(3')
- 3) (5')GAT GCG CTC CGT CGT CAC CC (3')
- 4) (5')GGG TGA CGA CGG AGG GCA TC(3')
- 5) (5')GTC GTC GGC GCC ATT ATG (3')
- 6) (5')CAT AAT GGC GCC GAC GAC(3')

- 7) (5')TTT GAG TTT CCT TAA CTG CC(3')
- 8) (5')GGC AGT TAA GGA AAC TCA AA(3')
- 9) (5')GTA CCG ACA GCA GTC GAG CA(3')
- 10) (5')TGC TCG ACT GCT GTC GGT AC(3')
- 11) (5')TGC CCG CCA CAC ATG(3')
- 12) (5')TTC CTC CAC TAG GTC GGC GT(3')

【請求項7】 下記の塩基配列以外の標的塩基配列に、一塩基のミスマッチもなくハイブリダイゼーションする請求項1～5の何れか1項に記載の核酸プローブ。

- 1) (5')TCT CAA ACT AGG ACC GAG TC(3')
- 2) (5')ATT GTG TAC GTT CAG CTT GC(3')
- 3) (5')GAT GCG CTC CGT CGT CAC CC (3')
- 4) (5')GGG TGA CGA CGG AGG GCA TC(3')
- 5) (5')GTC GTC GGC GCC ATT ATG (3')
- 6) (5')CAT AAT GGC GCC GAC GAC(3')
- 7) (5')TTT GAG TTT CCT TAA CTG CC(3')
- 8) (5')GGC AGT TAA GGA AAC TCA AA(3')
- 9) (5')GTA CCG ACA GCA GTC GAG CA(3')
- 10) (5')TGC TCG ACT GCT GTC GGT AC(3')
- 11) (5')TGC CCG CCA CAC ATG(3')
- 12) (5')TTC CTC CAC TAG GTC GGC GT(3')

【請求項8】 請求項1～7の何れか1項に記載の一対の核酸プローブを用いることを特徴とする核酸の測定若しくは検出をする方法。

【請求項9】 請求項1～7の何れか1項に記載の一対の核酸プローブを、複合微生物系または共生微生物系に添加することを特徴とする複合微生物系または共生微生物系における特定グループ若しくは特定菌の存在量を測定する方法。

【請求項10】 請求項1～7の何れか1項に記載の一対の核酸プローブを、複合微生物系または共生微生物系の細胞破壊液に添加することを特徴とする複合微生物系または共生微生物系における特定グループ若しくは特定菌の存在量を測定する方法。

【請求項11】 複合微生物系または共生微生物系が、有用物質生産培養系である請求項9または10に記載の複合微生物系または共生微生物系における特定グループ若しくは特定菌の存在量を測定する方法。

【請求項12】 複合微生物系または共生微生物系が、1～22の菌種数からなり、有用物質生産培養系である請求項9～11の何れか1項に記載の複合微生物系または共生微生物系における特定グループ若しくは特定菌の存在量を測定する方法。

【請求項13】 複合微生物系または共生微生物系に存在する微生物の16S rRNA、23S rRNAまたはそれらの遺伝子の塩基配列が解明されているものである請求項9～12の何れか1項に記載の複合微生物系または共生微生物系における特定グループ若しくは特定菌の存在量を測定する方法。

【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、一対の核酸プローブ、およびそのプローブを用いる複合微生物系または共生微生物系における特定グループ若しくは特定菌の存在量を測定する方法に関する。特に、微生物の16S rRNA若しくは23S rRNAまたはその遺伝子DNAにハイブリダイゼーションしFISH (fluorescence in situ hybridization) 法に用いることができる一対の蛍光色素分子で標識した一対の核酸プローブおよびそのプローブを用いる複合微生物系または共生微生物系における特定グループ若しくは特定菌の存在量を測定する方法に関する。

## 【0002】

【従来の技術】最近、複合微生物系を用いて特定物質を生産する方法が注目されている（別府：平成10年度農芸化学会大会講演要旨集；120頁；平成10年4月3日、名古屋大学）。それは、従来の単独の微生物からなる微生物系では生産できなかったものが、生産できるのではないかという期待からである。しかしながら、かかる系において、系内の微生物の活性量や動態などを特異的にそして簡便かつ迅速に解析する方法は、まだ確立されていないので、どの微生物がどのように働いているのかなどは、正しく認識できないでいる。そのような事情により、当該のような微生物系の機能開発は未だ一般化していないのが現状である。

【0003】また、深海化学合成共生系（チューブワーム共生系）、昆虫の内部共生微生物系、シロアリ腸内共生系、樹木と外生菌根菌の共生系などの、個々の微生物を単離・培養できない微生物系の研究が注目を浴びている（蛋白質・核酸・酵素；1217～1253ページ、43巻、1998年）。個々の微生物を単離・培養できないことから、その微生物の存在量を特異的にそして簡便にかつ迅速に測定する方法がこれらの分野においても問題になっている。

【0004】従来、前記のような複合微生物系および共生微生物系における特定グループ若しくは特定菌の存在量の測定は、16S rRNA若しくは23S rRNAまたはその遺伝子DNAにハイブリダイゼーションする一対のプローブを作製し、そのプローブの任意の位置に一つの蛍光色素を標識するFISH (fluorescence in situ hybridization) 法を用いて行うものである（Arch. Microbiol.、168巻、185～192頁、1997年）。

【0005】最近、短時間（約12時間）で定量的な結果を得ることができる、分子ビーコン（molecular beacon）法と称される方法が提案された（Applied and Environmental Microbiology；63巻、1143～1147ページ、1997年）。当該方法で使用される分子ビーコンは蛍光色素分子で標識した一種の核酸プローブで、オリゴヌクレオチドの両末端が互いに相補する配列構造

を有するのが特徴である。その構造のために両末端でステム構造、中央部でループ構造をとり得ることができる。両末端の一方に蛍光色素、他方にその蛍光を消去するクエンキヤー物質を結合させている。当該プローブは、溶液中において単独ではステムループ構造をとり蛍光を発しないが、ハイブリダイゼーションを起こし得る高分子核酸が存在する場合、当該高分子核酸にハイブリダイゼーションし、ステム構造が壊れる。その結果として、蛍光色素特有の蛍光を発するようになる。その蛍光の強度を測定することにより目的を達成することができる。

【0006】前記のFISH法では、未反応の核酸プローブが測定系に存在するので、標的核酸配列にハイブリダイゼーションした核酸プローブをメンブランフィルターなどの適当な支持体にトラップし、未反応の核酸プローブを洗浄などで除去する操作を必要としていた。そして支持体にトラップされ、かつ蛍光を発する微生物細胞を蛍光顕微鏡下計数するという手段が取られていた。これは大変な労力と根気を必要としていた。また、プローブの塩基数がハイブリダイゼーションの特異性から少なくとも15以上である必要があった。このような長いプローブを用いると細胞膜の透過性の問題が生じていた。この問題を解決するために、微生物を酵素、有機溶剤、若しくは界面活性剤などの化学的処理、または超音波などの物理的処理、またはそれらの併用処理などを行う必要があった。

【0007】分子ビーコン法は、溶液で行うことができる上に、12時間という短時間で結果が得られるという長所を有する。しかしながら、このプローブは、一つのオリゴヌクレオチドの両末端に蛍光色素分子とクエンキヤー物質を有し、目的核酸とハイブリダイゼーションする塩基配列を有するためにかなり分子量は大きなものになる。そのために、当該オリゴヌクレオチドの細胞膜透過性の問題から、適用できる微生物の範囲は限定されるという問題を有していた。12時間という短時間でも、複合微生物系または共生微生物系の刻々変化する培養系では、決して有用なものではない。

【0008】上記の事情から、できるだけ短いプローブ、即ち上記の各種方法のプローブの半分程度の長さのもので、プローブに一つの色素で標識されたプローブが望まれていた。また、プローブが標的核酸配列にハイブリダイゼーションしたときに未反応のプローブを測定系から除去したり、顕微鏡などを使用しなくても、複合微生物系または共生微生物系において特定グループ若しくは特定菌の存在量を特異的にそして簡便かつ1ないし3時間ぐらいで測定する方法が要望されていた。それは、複数の微生物からなる複合微生物系または共生微生物系の培養系で、有用物質を生産する場合、生産収率を上げるために、系内の微生物相を制御する必要に迫られるからである、即ち、培養が終了してから、微生物相の解析



では遅すぎる。

#### 【0009】

【発明が解決しようとする課題】本発明の課題は、上記の状況に鑑み、複合微生物系または共生微生物系において特定グループ若しくは特定菌の存在量を特異的にそして簡便かつ短時間に測定することができるプローブおよびそれを用いた、複合微生物系または共生微生物系において特定グループ若しくは特定菌の存在量を特異的にそして簡便かつ短時間に測定する方法を提供することである。

#### 【0010】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、前記課題を解決するにあたり、鋭意努力した結果、二つのオリゴヌクレオチドからなり、フルオロレサナンス・レゾナンス・エネルギー・トランスファー (Fluorescence Resonance Energy Transfer) (FRET) 現象を起こし得る一対の蛍光色素分子で、各々のオリゴヌクレオチドを標識した核酸プローブであり、目的塩基配列に当該二つの核酸プローブが、ハイブリダイゼーションする際、二つの核酸プローブが相互に向き合う末端塩基間の距離が塩基数にして0または1ないし2で、標的塩基配列にハイブリダイゼーションし、核酸プローブに標識されている蛍光色素分子が、FRETを最も効果的に発生する距離に位置するように標識された一対の核酸プローブに考え至った。そして、その一対のプローブを、複合微生物系または共生微生物系において特定グループ若しくは特定菌の存在量を測定する方法に適用すると、本発明の課題が達成できるという知見を得た。本発明はかかる知見に基づいて完成されたものである。

【0011】即ち、本発明は、

1) フルオロレサナンス・レゾナンス・エネルギー・トランスファー (Fluorescence Resonance Energy Transfer) (FRET) 現象を起こし得る一対の蛍光色素分子で、別々の目的塩基配列にハイブリダイゼーションできる二つのオリゴヌクレオチドを標識した二つの核酸プローブであり、目的塩基配列に当該二つの核酸プローブが、ハイブリダイゼーションする際、核酸プローブに標識されている蛍光色素分子がFRETを最も効果的に発生するように、(1) 一対の蛍光色素分子の一方が、二つのオリゴヌクレオチドにおいて相互に向き合う末端側のどちらか一方に標識されており、他の一方の蛍光色素分子が他の一方のオリゴヌクレオチドの鎖中に標識されているか、または、(2) 一対の蛍光色素分子の各々が、二つのオリゴヌクレオチドの各々の鎖中に標識されていることを特徴とする一対の核酸プローブ、また、(2) 前記1) の一対の核酸プローブを用いて、核酸の測定、若しくは検出する方法、また、(3) 前記1) の一対の核酸プローブを用いて、複合微生物系または共生微生物系における特定グループ若しくは特定菌の存在量を測定する方法を提供する。

#### 【0012】

【発明の実施の形態】次に好ましい実施の形態を挙げて本発明をさらに詳細に説明する。本発明は二つのオリゴヌクレオチドからなる一対の核酸プローブである。オリゴヌクレオチドはリボキシヌクレオチドまたはデオキシリボヌクレオチドまたは2-methyl-RNA、DNAなどの修飾核酸からなり、どのような核酸の標的配列にハイブリダイゼーションするように設計されても構わない。即ち、目的塩基配列に特異的にハイブリダイゼーションされればよく、塩基配列は特に限定されない。

【0013】本発明の一対の核酸プローブのオリゴヌクレオチドは、既知の方法、即ち、化学合成法若しくは市販の核酸合成機 (例えば、ABI394 (Perkin Elmer社製)) などを使用する方法により、調製することができる。その合成に際し、先ず塩基配列の設計をする。標的核酸のクローニング、塩基配列決定を行うことにより、その塩基配列の設計がなされる。それらの技術は現在普遍に行われているので、適当な成書を参考にして行えばよい (新版微生物学実験法、講談社サイエンティフィク、239〜249頁、1999年)。塩基配列の設計さえ行えば、オリゴヌクレオチドの合成を引き受けてくれる企業があるので、現在はそこに委託すればよい。例えば、株式会社ベックス、国際試薬株式会社、宝酒造 (株) などを挙げるができる。

【0014】本発明の一対の核酸プローブは、更に蛍光色素で標識されているものである。その蛍光色素はフルオロレサナンス・レゾナンス・エネルギー・トランスファー (Fluorescence Resonance Energy Transfer) (FRET) 現象を起こし得る一対の蛍光色素分子を有するものである。そして、オリゴヌクレオチドを標識している。本発明の一対の核酸プローブが、目的塩基配列にハイブリダイゼーションする際、核酸プローブに標識されている蛍光色素分子が、FRETを最も効果的に発生する距離に位置するように標識されたものである。標識は、一対の蛍光色素分子の一方が、一対のオリゴヌクレオチドにおいて相互に向き合う末端側のどちらか一方に標識し、他の一方の蛍光色素分子が他の一方のオリゴヌクレオチド配列の鎖中に標識してもよく、また、一対の蛍光色素分子の二つを、オリゴヌクレオチド鎖中に標識してもよい。より具体的には、標識は、例えば、一対の蛍光色素分子の一方が、一対のオリゴヌクレオチドにおいて相互に向き合う末端側のどちらか一方のリボースまたはデオキシリボース、或いは修飾核酸に標識し、他の一方の蛍光色素分子が他の一方のオリゴヌクレオチドの鎖中の核酸塩基 (例えば、アミノ基、ヒドロキシル基、ピリジミン塩基の5位の炭素) に標識してもよく、また、一対の蛍光色素分子の二つを、鎖中の核酸塩基 (例えば、アミノ基、ヒドロキシル基、ピリジミン塩基の5位の炭素) に標識してもよい。

【0015】本発明のFRET現象を起こし得る一対の蛍

光色素分子とは、FRETにおいて、一方がエネルギーの供与体（ドナー蛍光色素分子）となり、他方がその受容体（アクセプター蛍光色素分子）となり得る関係の対の蛍光色素分子を意味し、具体的例示をもって限定されるものではない、例えば、ドナー蛍光色素分子としては、フロオレセイン（fluorescein）、フルオレセインイソチオシアネート（fluorescein isothiocyanate）（FITC）、アクセプター蛍光色素分子としては、x-ローダミン（x-Rhodamine）、テトラメチルローダミンイソチオシアネート（Tetramethylrhodamine isothiocyanate）（TRITC）またはCY3（carbocyanine 3）などを挙げることができる。発光量から好ましいものとして、ドナー蛍光色素分子としてフロオレセイン、FITCを、アクセプター蛍光色素分子としてx-ローダミン、TRITCを挙げることができる。

【0016】対の蛍光色素分子が最もFRETを起こし得る距離は、蛍光色素分子の種類と分子の大きさと形状に依存する。しかし、一般的には20～80Åである。従って、オリゴヌクレオチドの配列構造は蛍光色素分子の種類と分子の大きさと形状に依存する。具体的には、ドナー蛍光色素分子としてフルオレセイン（fluorescein）、FITC、アクセプター蛍光色素分子としてローダミン、TRITCまたはCY3を使用した場合、蛍光色素分子で標識された塩基同士が2～30塩基、好ましくは3～20塩基離れて、目的の核酸にハイブリダイゼーションするように塩基配列構造に設計する。本発明においては、以下、便宜上、ドナー蛍光色素分子で標識されたオリゴヌクレオチドをドナープローブと、アクセプター蛍光色素分子で標識されたオリゴヌクレオチドをアクセプタープローブという。そして、本発明の一对の核酸プローブが目的核酸配列にハイブリダイゼーションしたとき、一对のプローブの相互に向き合う末端塩基間の距離は、前記のFRET現象が起こる距離に設計される。本発明においては、好ましくはその距離は塩基数にして0または1ないし2であるように設計される。

【0017】前記の蛍光色素を前記の一对のオリゴヌクレオチド配列の鎖中に標識するには、一般的には、例えば、標識対象の塩基としてピリミジン塩基をもつヌクレオシド、またその塩基の5位のがアミノリンカーで修飾されたヌクレオシドを用いるのが好適である。そのヌクレオシドを使用して、目的のオリゴヌクレオチドを合成する。合成後、アミノリンカーを蛍光色素分子にて修飾する。このようにして任意の位置の塩基を蛍光色素で標識できる。また、相互に向き合う末端側のリボースまたはデオキシリボースを標識するのも、キット試薬が市販されているので、それを使用するのが便利である。前記の合成は委託合成を行うのが、最も便利である（前記企業、株式会社パーキンエルマージャパンアプライト）。

【0018】本発明の一对の核酸プローブは前記のようにして調製されるものであるが、このプローブが、標的

塩基配列にハイブリダイゼーションするとFRET現象により蛍光を発するようになる。しかし、標的塩基配列と一塩基のミスマッチがあると蛍光強度は反応条件によっては99%以上減少する。そのために本発明の一对の核酸プローブは極めて特異性の高いものである。

【0019】既存のFRET現象を利用したハイブリダイゼーション法は、ドナー、アクセプターの蛍光分子を二つとも、別々の核酸配列の末端に修飾している。よって、従来法では、FRET現象を最適に起こさせるため、ハイブリダイズしたときの二つのプローブ間隔を約3～30塩基程度あける必要がある。従って、ドナープローブとアクセプタープローブとの間隔の決定は、必然的にFRETの効率に依存する。

【0020】しかしながら、本発明の一对の核酸プローブは以下のような効果を有する。

（1）ドナープローブとアクセプタープローブとの間隔を、例えば0にすることで、一つの連続した特異的配列を検出することができる。このため、これまで反応性や特異性の面から制限されてきた特異的配列の塩基数（約8～25塩基程度）を2倍（約16～50塩基程度）にすることができる。よって、検出の特異性を飛躍的に向上させることができる。

（2）従来から使用されていた既知の特異的配列についても、配列を二つに分割し、片方或いは両方のプローブ配列の鎖中に蛍光物質を修飾することで、適応できる。

（3）前記（2）の方法で使用した場合、プローブ一つ当たりの塩基数が少なくなり、FISH法で問題となる細胞膜の透過性の問題を低減できる。塩基数が少なくなった場合、通常のDNAをプローブ配列に使用するとプローブのT<sub>m</sub>値が低下し、ターゲットとの反応性が悪くなるので、プローブ配列のT<sub>m</sub>値を上げターゲットとの反応性を良好にするため、プローブ配列にはRNAまたは2'-o-methyl RNA、PNA等の修飾核酸を使用すればよい。

（4）本発明のプローブ配列の決定は、検出したい特異的配列のみを決定し、それを二つに分割すればよく、プローブ設計が簡便となる。この場合特異性向上のため、二つのプローブのT<sub>m</sub>値が一致するように分割するのがよい。

（5）前記のように両プローブ間に一本鎖の部分がなく（或いは少なく）することが可能なため、ドナー、アクセプター蛍光物質標識間の核酸は二重らせん構造をとる。このため、ドナー、アクセプターの距離は正確に規定することができ、この距離はターゲットの核酸配列によって変化しにくい。よって、実験を伴う試行錯誤的なプローブ開発が必要なくなる。

【0021】本発明では、ドナー蛍光物質、アクセプター蛍光物質の片方或いは両方を、ドナープローブ配列、アクセプター配列の鎖中に修飾する。この点がプローブ作製上、既存のFRET現象を利用したハイブリダイゼ

ーション法と大きくことなる点である。このため蛍光物質は、プローブ配列鎖中の任意の位置に修飾可能となり、ドナープローブ配列、アクセプタープローブ配列の間隔がたとえ0塩基であっても、FRET現象が最もよく見られるように設計することができる。このように、本発明の一对のプローブは、ドナープローブとアクセプタープローブの間隔をFRET効率と独立に決定できる。

【0022】本発明の一对の核酸プローブは、各種核酸の測定、検出に好適に使用できる。特に、真核生物若しくは原核生物の16SrRNA若しくは23SrRNAまたはその遺伝子DNAに特異的にハイブリダイゼーションするように設計しておくことにより、複合微生物系または共生微生物系における特定グループ若しくは特定菌の存在量を好適に測定することができる。

【0023】本発明において、複合微生物系とは、少なくとも二種以上の微生物が混在する系であり、その系は、生育状態または静菌状態どちらでもよい。より具体的には、培養状態、緩衝液に懸濁状態、または自然の生態系から直接採取して得られるそのものの状態のものなどである。その系に存在する個々の微生物は単離・培養の是非を問わないものである。また、共生微生物系とは、少なくとも一種以上の微生物が微生物以外の生物と共存状態にある系である。その系に存在する個々の微生物は、前記同様、単離・培養できてもできなくともよい。

【0024】微生物とは一般的に云う微生物のことで、特に限定されるものではない。例えば、真核微生物、原核微生物、その他マイコプラズマ、ウイルス、リッケチャなどを挙げることができる。特定グループ若しくは特定菌とは、前記の系において、例えば、どのように活躍しているのか調べたい菌株のことである。

【0025】本発明の一对の核酸プローブを適用できる複合微生物系および共生微生物系は上記のように定義されるが、具体的には次のような系における微生物汚染系を挙げることができる。例えば、

- 4) 食品微生物汚染系(微生物汚染検査)、
- 5) 各種微生物を使用する醸造系(酵母を用いるワイン、ビール、日本酒、焼酎などのアルコール生産、酢酸菌を用いる食酢生産、かびを用いるコウジ生産など)、
- 6) その他、各種微生物を使用する各種有用物質生産系(放線菌を用いる物質生産、細菌を用いるアミノ酸若しくは核酸関連物質生産など)。

これらの系では、系外から雑菌と称される毒素等の有害物質を生産する微生物、また有用物質の生産を阻害する微生物が汚染する、そして、雑菌の存在量を迅速に測定する必要である。雑菌は特定グループ若しくは特定菌で、系全体が複合微生物系である。例えば、食品汚染系では、かび全体、酵母全体、または、細菌全体の存在量を測定することで目的は達成できる、それらの菌は特定

グループ若しくは特定菌である。かびによるコウジ生産は開放系で行われるので、細菌汚染がコウジの品質を悪くする。この場合、細菌は特定グループ若しくは特定菌で、コウジ全体が複合微生物系である。このような有用物質生産系(複合微生物系)において、雑菌(特定グループ若しくは特定菌)の存在量を測定に、本発明の一对の核酸プローブは極めて役に立つ。

【0026】また、本発明においては、好適な系は、系に存在する菌の具体的な菌名が判明している系を挙げることができる。そして、より好適には系に存在する菌の16SrRNA、23SrRNA、またはそれらの遺伝子の塩基配列が解明されている系である。そして複数の菌の共同作用で有用物質を生産している系である。系内の微生物相(菌の存在比)を制御しなければ、有用物質の生産の収率が向上しないような系である。このような場合は、菌の存在比を少なくとも1~3時間以内に測定する必要がある。特に系内の微生物の菌の種類(菌種数:16SrRNA、23SrRNAの塩基配列を同じくする菌の種類)は、好ましくは2~22、より好ましくは2~10である。22を超えると、微生物の相互作用が複雑で、実際の有用物質の生産に適していない。その具体例として、*Agrobacterium* *Acenetobacter* *Oerskovia* *Entrobacter* からなる複合微生物系(R-3菌と称されている。)で、粘性物質(APR-3)生産系(Biosci.Biotech.Biochem. 58(9)巻、1589~1594頁、1994年)などを挙げることができる。

【0027】本発明において複合微生物系の特定グループとは、例えば、真核微生物と原核微生物が混在している複合微生物系における原核微生物、また原核微生物が混在している系におけるグラム陽性菌をいう。特定菌とは例えば有用物質を生産している複合微生物系においては、前記に示したように有用物質の生産の収率を左右している菌である。しかしながら、本発明は上記の具体例をもって限定されるものではない。

【0028】本発明において、複合微生物系、共生微生物系、特にその細胞系に本発明の一对の核酸プローブを添加して、特定グループ若しくは特定菌の存在量を測定する場合、一对の核酸プローブが標的塩基配列にハイブリダイゼーションしたとき、標的塩基配列の塩基数の合計が16から50、好ましくは20から40である。そして、一对の一方の核酸プローブは、8から25、好ましくは10から20である。そして、塩基数が25以上の場合、核酸プローブの細胞の透過性が悪くなり、また7以下の場合、ハイブリダイゼーションの特異性が悪くなり、微生物の実際の存在量を示さなくなる。

【0029】複合微生物系、共生微生物系に一对の核酸プローブを添加して、特定グループ若しくは特定菌の存在量を測定する場合、その核酸プローブの塩基配列は、特定グループの存在量を測定するか、特定菌の存在量を測定するかで異なる。この場合、本発明の一对の核酸プ

ローブは、真核生物若しくは原核生物の16SrRNA若しくは23SrRNAまたはその遺伝子DNAの特定配列に特異的にハイブリダイゼーションするので、特定グループの存在量を測定する場合、16SrRNA若しくは23SrRNAまたはその遺伝子DNAにおいて、特定グループ間でよく保存されている配列（即ち、共通の配列）を利用すればよい。現在、微生物における16SrRNA若しくは23SrRNAまたはその遺伝子DNAの塩基配列が決定されている。そして、門間、属間、種間において、よく保存されている配列、非保存配列が決定されていて、微生物の同定に利用されている。この方法は微生物の同定の主流をなしている。それで本発明の一対の核酸プローブの塩基配列は容易に設定できる。具体的にはEMBL、GenBank、DDJB、RDPなどのデータベースを検索すればよい（文献名：ゲノムネットのデータベースの利用法、共立出版、1996年）。

【0030】例えば、原核微生物によく保存されている以下の配列にハイブリダイゼーションするプローブを使用すると、真核微生物と原核微生物とからなる複合微生物系において、原核微生物の存在量が測定できる。

- 1) (5')TCT CAA ACT AGG ACC GAG TC(3')
- 2) (5')ATT GTG TAC GTT CAG CTT GC(3')
- 3) (5')GAT GCG CTC CGT CGT CAC CC (3')
- 4) (5')GGG TGA CGA CGG AGG GCA TC(3')
- 5) (5')GTC GTC GGC GCC ATT ATG (3')
- 6) (5')CAT AAT GGC GCC GAC GAC(3')
- 7) (5')TTT GAG TTT CCT TAA CTG CC(3')
- 8) (5')GGC AGT TAA GGA AAC TCA AA(3')
- 9) (5')GTA CCG ACA GCA GTC GAG CA(3')
- 10) (5')TGC TCG ACT GCT GTC GGT AC(3')
- 11) (5')TGC CCG CCA CAC ATG(3')
- 12) (5')TTC CTC CAC TAG GTC GGC GT(3')

これらのものでも、好適には、上記5)、6)および11)などを挙げることができる。

【0031】このようにして、前記の塩基配列以外の配列中に、特定菌に特異的な配列があるので菌に応じて特定菌用のプローブの塩基配列を設定する。また、ある複合微生物系の具体的な微生物が判明しない場合、複合微生物から核酸を抽出して、PCR法で16SrRNA若しくは23SrRNAまたはその遺伝子DNAを増幅して、系に含まれていた核酸を分離し、その配列を決定する。16SrRNAの場合、最大でも1500～1700bp位の塩基配列なので現在の技術水準では容易にその全塩基配列は決定できる（Nucleic Acid Research 17巻7843～7853頁 1989年；新版微生物学実験法 203～239頁 1999年 講談社サイエンティフィック）。また、国際試薬株式会社へ解析委託すると便利である。一回の操作で1000塩基を解析してくれる。

【0032】前記のようにして塩基配列が設定され、本

発明の対の核酸プローブが調製される。前記のことから、本発明の対の核酸プローブを複合微生物系または共生微生物系に添加し、特定グループ若しくは特定菌の16SrRNA若しくは23SrRNAまたはその遺伝子DNAにハイブリダイゼーションさせた後、発生する蛍光色の強度或いはドナー蛍光色素とアクセプター色素の蛍光強度比を測定して特定グループ若しくは特定菌の存在量を測定することになる。本発明においては、複合微生物系または共生微生物系の生細胞系に適用できるが、各種酵素処理、各種化学試薬処理、各種界面活性剤処理、超音波（ソニック）、細胞破碎等の物理的処理などを受けた細胞は勿論、細胞のホモジネートに本発明の核酸プローブと添加して、発生する蛍光色の強度を測定して特定グループ若しくは特定菌の存在量を測定する方法も、より好適な方法である。

【0033】前記の測定方法は、従来の分子ビーコン法（Applied and Environmental Microbiology ; 63巻 1143～1147頁 1997年）などの方法と同様である。例えば、以下の如くである。核酸プローブを添加する前に、測定系のpHを緩衝液などにより7前後（中性付近）に調整する。

【0034】複合微生物系または共生微生物系における特定グループ若しくは特定菌は、細胞数として $10^6 \sim 10^8$ 個/ml、好ましくは $10^7$ 個/mlに調整するのが好適である。それは希釈、または遠心分離などによる濃縮などで行うことができる。細胞数が $10^6$ 個/ml未満のとき、蛍光色の強度が弱く、測定誤差が大きくなる。 $10^8$ 個/mlを超えるときは、複合微生物系または共生微生物系の蛍光強度が強すぎるため特定微生物の存在量を定量的に測定することができなくなる。菌体濃度が濃い場合は、希釈で対応することが可能である。

【0035】添加するドナー核酸プローブの濃度は、複合微生物系または共生微生物系における特定グループまたは特定菌の細胞数に依存する。細胞数 $1 \times 10^8$ /mlに対して0.5～2.0nM濃度、好ましくは1.0nM濃度である。0.5未満のときは、特定グループまたは特定菌の微生物の存在量を正確に反映したデータにならない。そして、ドナー核酸プローブ1nM濃度に対してアクセプター核酸プローブを1～4nM、好ましくは1.5～2.5nMの割合で添加するのが好適である。ドナー核酸プローブ1nM濃度に対してアクセプター核酸プローブが1nM未満のときは、ターゲットに完全に一対のプローブがハイブリダイゼーションしないために、当該系の蛍光強度は実際の特定グループまたは特定菌の微生物の存在量より小さくなる。4nMを超えるときは、アクセプター核酸プローブ過剰となり無駄になる。

【0036】次に本発明の核酸プローブと特定グループ若しくは特定菌の16SrRNA若しくは23SrRNAまたはその遺伝子DNAにハイブリダイゼーションさせるときの反応温度は、ドナー核酸プローブと当該16

SrRNA若しくは23SrRNAまたはその遺伝子DNAの特異的部位にハイブリダイゼーションしたハイブリダイゼーション物のTm値 $\pm 10^{\circ}\text{C}$ 、好ましくは $\pm 5^{\circ}\text{C}$ 、特に好ましくは $\pm 2^{\circ}\text{C}$ に設定する、このことにより非特異的なハイブリダイゼーションを防止することができる。Tm $-10^{\circ}\text{C}$ 未満のときは非特異的なハイブリダイゼーションが起こり、Tm $+10^{\circ}\text{C}$ を越えるときはハイブリダイゼーションが起こらない。なお、Tm値は本発明の核酸プローブを設計する実験において求めることができる。当該核酸プローブとハイブリダイゼーションする相補配列のオリゴヌクレオチドを核酸合成機などで化学合成し、当該核酸プローブとのハイブリダイゼーション物のTm値を通常の方法で測定する。また、その反応時間は30～180分間、好ましくは60～90分間である。30分間未満のときは、ハイブリダイゼーションが未反応になる。180分間を超える場合は目的配列構造以外の配列にも本発明の核酸プローブが結合するようになるので、測定誤差が大きくなる。

【0037】前述の方法の他に、前述した方法でハイブリダイゼーションを行なった後の菌体をスライドグラス或いはメンブレンフィルター上に固定化し、顕微鏡観察を行なうことも可能であり、この場合、より厳密な構成菌の菌体数・構成比の情報を得ることが可能である。以下にスライドグラス上への固定化の方法を示す。前述のハイブリダイゼーション処理済の菌体懸濁液を、約1 $\mu\text{l}$ 、8穴のゼラチンコーティングされたスライドグラス上に乗せる。これを乾燥させ、落射蛍光顕微鏡下で観察する。また、本法の思想で設計したプローブを用いれば、菌体破砕液中のターゲット16SrRNA若しくは23SrRNAのみを検出可能である。菌体破砕することにより、プローブ透過の問題がクリアできることから、プローブの透過性が悪い菌をターゲットとした場合は非常に有効である。

【0038】前記のような条件で本発明の核酸プローブを特定グループ若しくは特定菌の16SrRNA若しくは23SrRNAまたはその遺伝子DNAにハイブリダイゼーションさせた後、複合微生物系または共生微生物系の発色する蛍光色の強度を測定することになる。この場合、ドナー核酸プローブの蛍光色素分子を特定波長で励起すると、アクセプター核酸プローブが存在するとき、ドナー蛍光色素分子の発色強度が減少し、アクセプター核酸プローブの蛍光強度が増加する。

【0039】前記のようにして測定された蛍光色の強度は、複合微生物系または共生微生物系における特定グループ若しくは特定菌の存在量と比例する。それは16SrRNA若しくは23SrRNAまたはその遺伝子DNAの量と特定グループ若しくは特定菌の存在量とが比例するからである。

【0040】なお、本発明において、複合微生物系における微生物以外の成分は、本発明の核酸プローブと特定

グループ若しくは特定菌の16SrRNA若しくは23SrRNAまたはその遺伝子DNAとのハイブリダイゼーションを阻害しない限り、またはFRET現象および蛍光色の発色を阻害しない限り、特に限定されない。例えば、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 、 $\text{K}_2\text{HPO}_4$ 、 $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ 、 $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ などのリン酸塩、硫酸、硝酸、尿素などの無機窒素類、マグネシウム、ナトリウム、カリウム、カルシウムなどのイオンの各種塩類、マンガン、亜鉛、鉄、コバルトなどの微量金属イオンの硫酸塩、塩酸、炭酸塩などの各種塩類、さらにビタミン類などが適当に含まれていてもよい。もし上記の阻害が観察される場合は、遠心分離などの操作で複数の微生物が混在する菌体を分離し、再び緩衝液系などに懸濁すればよい。

【0041】上記の緩衝液としては、リン酸緩衝液、炭酸緩衝液、トリス・塩酸緩衝液、トリス・グリシン緩衝液、クエン酸緩衝液、グット緩衝液などの各種緩衝液をも用いることができる。緩衝液の濃度は、ハイブリダイゼーション、FRET現象、蛍光発色を阻害しない濃度である。その濃度は緩衝液の種類に依存する。緩衝液のpHは4～12、好ましくは5～9である。

【0042】

【実施例】次に実施例および比較例を挙げて本発明をさらに具体的に説明する。

#### 実施例1

大腸菌 (*Escherichia coli*) の16SrRNAの5'末端から数えて338から355番目の核酸塩基配列(5') ACU CCU ACG GGA GGC AGC(3')にハイブリダイゼーションする本発明の一对の核酸プローブの調製を行った、上記の配列は真正細菌のグループ特異的配列として知られている。

#### 1) ドナー核酸プローブ

5'末端から数えて5番目シトシン塩基の5位の炭素をFITCで標識した核酸プローブ：(5')GCT GC(FITC)CTCC(3')を調製した。標識するシトシンとして、シチジシンのアミノ基がアミノリンカーで修飾されたもの(ケムジーン(株)より購入)を用い、また反応温度をあげるため、FITCで標識する以外のヌクレオチドは、2-o-Methyl化されたリボヌクレオチドを用い、DNA合成機ABI394 (Perkin Elmer社製)を使用して前記塩基配列のオリゴヌクレオチドを合成した。当該オリゴヌクレオチドを合成した後、5'末端から数えて5番目シトシン塩基の5位の炭素に結合したアミノリンカーをFITCで標識した。当該反応物をNAP-25カラム(ファルマシア社製)でゲルろ過を行い、未反応のFITCを除去した。さらに逆相HPLC(B gradient: 15～65%、25分間)を以下の条件で行った、そして、保留時間(retention time: RT) 20分近辺に溶出するメインピークを分取した。分取した画分を凍結乾燥して本発明の一对の一方のドナー核酸プローブ、即ち(5')GCT GC(FITC)CTC C(3')33 $\mu\text{g}$ を得た。

## 【0043】逆相クマトグラフィーの条件:

溶出溶剤A: 0.05N TEAA 5%CH<sub>3</sub>CN  
 グラジエント用溶剤B: 0.05N TEAA 40%CH<sub>3</sub>CN  
 カラム: CAPCEL PAK C<sub>18</sub>; 6×250mm  
 溶出速度: 1.0ml/min  
 温度: 40℃  
 検出: 254nm

## 【0044】2) アクセプター核酸プローブの調製

3'-末端側の鎖中のシトシン塩基(5'-末端側から3番目のチミン塩基)のアミノ基をTRITCで標識した核酸プローブ: (5')CGT(TRITC)AGG AGT(3')を調製した。反応温度を上げるため、TRITCで標識する以外のヌクレオシドは、2-O-Methyl化されたリボヌクレオシドを用いた。TRITCで標識するチミンは、塩基の5位にC-5のアミノリンカーが修飾されたもの(ケムジーン(株))を用いた。これらのヌクレオシドを用い、DNA合成機ABI394(Perkin Elmer社製)を使用して前記配列のオリゴヌクレオチド、即ち本発明のアクセプター核酸プローブ配列を合成した。プローブ配列を合成後、5'末端より3番目に位置するチミンのアミノリンカーをTRITCにより標識した。精製は前記ドナー核酸プローブと同様の方法で行った。

## 【0045】実施例2

殺菌したニュートリエントブロス(NB)(Difco社製)液体培地50ml(組成: NB, 0.08g/100ml)を含む200ml容の三角フラスコを用いて、大腸菌JM109株を37℃で一晩振盪培養した。培養液1mlを1.5ml容量のエッペンドルフ遠心チューブで遠心分離し、菌体を得た。30mMリン酸緩衝液(ソーダ塩)(pH: 7.2)100μlで菌体を一回洗浄した。菌体を130mM NaCl含有の前記リン酸緩衝液100μlに懸濁した。当該懸濁液を氷冷中で40分間超音波処理(出力: 33W、発振周波数: 20kHz、発振法: 0.5秒発振0.5秒休止)、ホモジネートを作製した。

【0046】前記ホモジネートを遠心分離した後、上澄液を採取し蛍光光度計のセルに移した。それを36℃に温調した。36℃に予め加温した前記のドナーおよびアクセプター核酸プローブの各々の溶液(ドナープローブはDNAとして0.35ng/μl アクセプタープローブはDNAとして0.18ng/μl)50μlを添加し、さらに緩衝液を加え、全量を2mlにした。36℃に温調しながら90分間大腸菌16SrRNAと本発明の核酸プローブとをハイブリダイゼーションした。90分後蛍光光度計で測定した(励起光: FITC、測定蛍光色: 580nm)、その結果を図1に示した。図1から分かるように菌体量0.660と蛍光色の強度との間に、比例関係が見られた。

## 【0047】実施例3

実施例2で得られた大腸菌JM109(株)の菌体に実施例

2と同一の培地、培養条件で調製したシュウドモナス・ボウシモビルス 421Y株(*Pseudomonas paucimobilis*) (現在名: スフィンゴモナス・ボウシモビルス)

(FERM P-5122)の菌体を同濃度混合し、複合微生物系を調製した。得られた混合液(大腸菌JM109株の菌体濃度は実施例2と同一)について、実施例2と同じ方法によりホモジネートを調製した。当該ホモジネートに下記に示すドナーおよびアクセプター核酸プローブを実施例2と同様に添加し、実施例2と同一の方法により測定した。使用したプローブは、大腸菌JM109株の属するプロテオバクテリアのガンマーサブクラスに特異的な以下の配列のプローブを用いた。標的塩基配列は23SrRNAである。プローブの作製は実施例1と同様な方法により行なった。

・ドナー核酸プローブ: (5')GCC T(FITC)TCC C(3')

・アクセプター核酸プローブ: (5')ACA TC(TRITC)GTT T(3')

結果は実施例2で示した図1と一致した。このことにより2種以上の微生物が複合する系においても目的微生物のみを特異的に検出し、その存在量を測定することに成功した。この実験例において、培養液から菌体を採取始めてから測定終了までの時間は2時間であった。

## 【0048】比較実験例1

実施例3と同様な塩基配列のオリゴヌクレオチドの両端に5'-CCCCCなる塩基配列と、GGGGG-3'なる塩基配列を追加したオリゴヌクレオチドを実施例1と同様に調製した。このオリゴヌクレオチドから、P. Schofieldらの方法(Applied and Environment. Microbiol. 63巻 1143~1147頁 1997年に)準じて、分子ビーコンを作製した。クエンチャーとしてdabcyl-N-hydroxysuccinimideを3'末端に、発光体としてFITCを5'末端に結合した。当該分子ビーコンを用いる以外、実施例3と同様にハイブリダイゼーションした。この場合、菌体量OD<sub>660</sub>値は0.6でハイブリダイゼーションを行った。蛍光強度が平衡になるまでの時間を測定した結果、図2の如くになった。平衡になるまで10時間を要した。

## 【0049】実施例4

実施例3の本発明の一方の核酸を使用して比較実験例1と同様に蛍光強度が平衡になるまでの時間を測定した結果、図2の如くになった。平衡になるまで60分を要した。このように、蛍光強度が平衡になるまでの時間が極めて短い。これは本発明の一方のプローブは、分子ビーコンと異なり、プローブ内で2次構造をとらない事が原因と考えられる。そして、この現象は、短時間に本発明の目的が達成できることを示す。

## 【0050】実施例5

本発明の一方の核酸プローブと標的塩基配列とのハイブリダイゼーションにおける、塩基ミスマッチと蛍光強度の関係を検討した。標的塩基配列として、下記の塩基排

列を有するオリゴヌクレオチドを実施例1と同様にして合成した。本発明の一対の核酸プローブとして実施例3で用いたものを用いた。

A : (5')AAA CGA TGT GGG AAG GC(3') (本発明の一対の核酸プローブとミスマッチなし。)

B : (5')AAA G\*GA TGT GGG AAG GC(3') (本発明の一対の核酸プローブと1塩基ミスマッチあり。)

C : (5')AAA G\*GA TGT GGG AT\*G GC(3') (本発明の一対の核酸プローブと2塩基ミスマッチあり。)

但し、上記の\*印はミスマッチ塩基である。

#### 【0051】実験条件

(1) 菌体量OD<sub>660</sub> : 0.6

(2) 本発明の一対の核酸プローブ

ドナープローブ : 4 nM

アクセプタープローブ : 16 nM

(3) ハイブリダイゼーション時間 : 90分

(4) ハイブリダイゼーション温度 : 36℃

(5) 実験操作 : 実施例2と同様。

実験結果を表1に示した。

#### 【0052】

表1 塩基のミスマッチと蛍光強度の関係

塩基配列	蛍光強度	比
A	20	1
B	0.15	0.0075
C	0.05	0.0025

本発明の一対の核酸プローブは特異性が高いことが表1から分かる。

#### 【0053】

【発明の効果】前記のように、本発明の一対の核酸プローブは以下のような効果を有する。

(1) ドナープローブとアクセプタープローブとの間隔を、例えば0にすることで、一つの連続した特異的配列

を検出することができる。このため、これまで反応性や特異性の面から制限されてきた特異的配列の塩基数(約10~25塩基程度)を2倍(約20~50塩基程度)にすることができる。よって、検出の特異性を飛躍的に向上させることができる。

(2) 従来から使用されていた既知の特異的配列についても、配列を二つに分割し、片方或いは両方のプローブ配列の鎖中に蛍光物質修飾することで、適応できる。

(3) 二つの方法で使用した場合、プローブ一つ当たりの塩基数が少なくなり、FISH法で問題となる細胞膜の透過性の問題を低減できる。

(4) 本発明のプローブ配列の決定は、検出したい特異的配列のみを決定し、それを二つに分割すればよく、プローブ設計が簡便となる。

(5) 前記のように両プローブ間に一本鎖の部分がなく(或いは少なく)することが可能なため、ドナー、アクセプター蛍光物質標識間の核酸は二重らせん構造をとる。このため、ドナー、アクセプターの距離は正確に規定することができ、この距離はターゲットの核酸配列によって変化しにくい。よって、実験を伴う試行錯誤的なプローブ開発が必要なくなる。

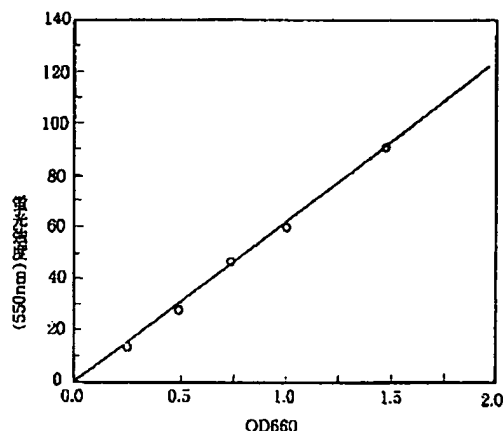
【0054】また、本発明の一対の核酸プローブを用いると、複合微生物系または共生微生物における特定グループ若しくは特定菌の存在量を、特異的、簡便かつ迅速に測定できる。

#### 【図面の簡単な説明】

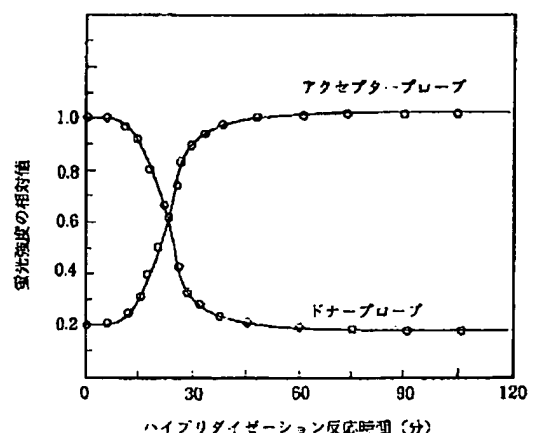
【図1】 本発明の核酸プローブと大腸菌16SrRNAとのハイブリダイゼーションにおける菌体量と蛍光色の強度の関係を示す図。

【図2】 本発明の一対の核酸プローブを用いてのハイブリダイゼーション反応における蛍光強度の変化を示す図。

【図1】



【図2】



フロントページの続き

(74) 上記1名の代理人 100077698

弁理士 吉田 勝広

(72) 発明者 倉根 隆一郎

茨城県つくば市東1丁目1番3 工業技術  
院生命工学工業技術研究所内

(72) 発明者 金川 貴博

茨城県つくば市東1丁目1番3 工業技術  
院生命工学工業技術研究所内

(72) 発明者 鎌形 洋一

茨城県つくば市東1丁目1番3 工業技術  
院生命工学工業技術研究所内

(72) 発明者 蔵田 信也

東京都千代田区東神田1-9-8 環境エ  
ンジニアリング株式会社内

(72) 発明者 山田 一隆

東京都千代田区東神田1-9-8 環境エ  
ンジニアリング株式会社内

(72) 発明者 横幕 豊一

東京都千代田区東神田1-9-8 環境エ  
ンジニアリング株式会社内

(72) 発明者 小山 修

東京都千代田区東神田1-9-8 環境エ  
ンジニアリング株式会社内

(72) 発明者 古庄 健太

東京都千代田区東神田1-9-8 環境エ  
ンジニアリング株式会社内